

# ANNALES

## DE L'INSTITUT PASTEUR

FONDÉES SOUS LE PATRONAGE DE **M. PASTEUR**

PAR

**E. DUCLAUX**

---

### COMITÉ DE RÉDACTION

**D<sup>r</sup> CALMETTE**, sous-directeur de l'Institut Pasteur ;  
**D<sup>r</sup> L. MARTIN**, sous-directeur de l'Institut Pasteur ;  
**D<sup>r</sup> ROUX**, directeur de l'Institut Pasteur ;  
**D<sup>r</sup> VAILLARD**, membre de l'Académie de Médecine.

---

TOME QUARANTE-CINQUIÈME

Juillet-Décembre 1930

AVEC TROIS PLANCHES

---

PARIS

**MASSON ET C<sup>o</sup>, ÉDITEURS**

LIBRAIRES DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE

120, Boulevard Saint-Germain (6<sup>e</sup>).

QR

1

A475

v. 45

July-Dec.

1930

PER

PARIS. — A. MARETHEUX ET L. PACTAT, IMP., 1, RUE CASSETTE. — 1930.

# ANNALES DE L'INSTITUT PASTEUR

---

## L'INFLUENCE DU CALCIUM SUR L'ÉVOLUTION DES CULTURES DE CHARBON

par les D<sup>rs</sup> J. BORDET et E. RENAUX.

(AVEC PLANCHE I, EN COULEUR)

*(Institut Pasteur de Bruxelles.)*

Les recherches relatives à la variabilité microbienne se sont beaucoup développées depuis quelques années et éveillent vivement l'attention non seulement des savants qui se consacrent à la Biologie générale, mais également de ceux qui, spécialisés en Bactériologie médicale, s'adonnent à l'étude de l'infection et de l'immunité. Elles apportent aux uns d'utiles documents concernant le problème fondamental de l'évolution et de la définition de l'espèce. Elles enseignent aux autres qu'au sein d'une même espèce de curieuses corrélations sont parfois décelables entre la virulence des microbes, leur forme telle que le microscope la révèle ou bien encore l'aspect macroscopique de leurs cultures, et que la variabilité peut se trahir par la façon dont les microbes se comportent vis-à-vis des facteurs qui concourent à la protection de l'organisme, phagocytes ou anticorps notamment. Des faits nombreux et patents de variabilité ont été signalés, d'ordre morphologique, biochimique, pathogé-



nique, et sérologique. Une culture pure n'est pas parfaitement homogène ou ne reste pas longtemps telle. Tous les individus qui la peuplent ne sont pas absolument équivalents, leurs traits distinctifs sont souvent transmissibles à la postérité, permettant de ce fait l'apparition de variétés plus ou moins distinctes et stables. La variabilité est sûrement un attribut foncier de l'être vivant, une de ses caractéristiques primordiales. En effet, lorsque nous parvenons par voie chimique ou physique à modifier une culture microbienne, nous trouvons d'habitude que tous les germes impressionnés ne se sont pas comportés exactement de même, qu'ils ne se sont pas adaptés avec le même succès. L'expérience aboutit à la prédominance des individus le plus aptes à tolérer l'influence mise en jeu, de telle sorte que le changement finalement observé n'a pas été, à proprement parler, créé par l'agent que l'on a fait intervenir. Celui-ci s'est borné à révéler, en les rendant souvent plus profondes, des différences préexistantes. Souvent, en effet, ces différences spontanément apparues sont susceptibles de s'exagérer grâce aux processus de sélection qui s'effectuent sous la pression des influences extérieures, et qui sont particulièrement efficaces lorsque les germes se trouvent aux prises avec des forces adverses, capables de menacer leur existence, telles, en immunité, les forces défensives de l'organisme. Le fait que la maladie infectieuse est un conflit où chacun des adversaires doit déployer de multiples ressources et faire preuve de souplesse adaptative implique immédiatement qu'il convient d'étudier avec un soin égal les potentialités de la culture inoculée et les facteurs de protection dont l'organisme dispose. C'est parce que l'on se rendait compte de cette vérité évidente que, pour l'étude de la variabilité, le choix s'est fréquemment porté sur des microbes pathogènes.

Nous ne mentionnerons pas ici les influences déjà connues qui, capables d'assurer la prédominance de certaines races, rendent plus apparente l'aptitude naturelle des microbes à la variabilité. Tout récemment encore, l'un de nous a fait à ce sujet un bref exposé (1) et rappelé notamment certaines

(1) J. BORDET, Les facteurs d'évolution des cultures microbiennes. *Toulouse médical*, 1<sup>er</sup> septembre 1929.



données antérieurement signalées (1) concernant le comportement des divers types microbiens en présence des principes lytiques ou bactériophages. A vrai dire, les partisans de la théorie de d'Hérelle estiment que la bactériophagie est un phénomène nettement pathologique et de caractère exceptionnel relevant de l'ingérence d'un parasite ultramicroscopique. Mais la théorie de l'autolyse transmissible que nous défendons considère les processus lytiques avec leurs effets sur l'évolution des cultures comme étant en dernière analyse l'expression de potentialités inscrites dans le cadre du fonctionnement bactérien normal, de telle sorte que, dans ce cas encore, on est autorisé à croire qu'on se trouve en présence d'un problème essentiellement physiologique. S'il est vrai que les espèces microbiennes, même ténues, autant qu'il est possible, à l'abri des influences modificatrices extérieures et cultivées à l'état pur, ne restent pas figées dans une immobilité absolue, si en d'autres termes le libre jeu des facultés inhérentes à la vie permet aux bactéries de se modifier spontanément dans une certaine mesure, on peut exprimer un tel fait en disant que le milieu nutritif ambiant suffit à procurer à ces êtres tous les éléments de leur variabilité. Or, la matière vivante avec l'ensemble de ses qualités, variabilité comprise, est incessamment reconstituée par l'assimilation des matériaux alimentaires. Dans ces conditions on peut se demander s'il ne serait pas possible de découvrir, parmi ceux-ci, quelque agent spécialement propice à la variabilité, quelque substance capable de jouer, dans l'apparition des modifications observables, un rôle bien appréciable. Les expériences que nous allons relater et qui à vrai dire concernent uniquement la bactériodie charbonneuse, montreront que le calcium mérite à ce propos d'attirer l'attention.

#### I. — ÉVOLUTION DES CULTURES DE CHARBON SUR GÉLOSE ORDINAIRE.

Souvent, la variabilité se décèle par la diversité d'aspect des colonies isolées sur les milieux de culture solides. Dans cet ordre d'idées il est un fait qui sollicite vivement l'attention, car

(1) Voir notamment : J. Bordet et E. Renaux, L'autolyse microbienne transmissible ou le bactériophage. Ces *Annales*, 42, novembre 1928.

il se retrouve si fréquemment qu'il semble avoir une signification générale. C'est la dissociation de l'espèce microbienne en deux types donnant des colonies très différentes et qu'à l'exemple des auteurs anglo-saxons on désigne habituellement par les lettres R (rough) et S (smooth). On sait par exemple qu'en soumettant à la technique de l'isolement une culture de *B. coli* qui a été entretenue au laboratoire pendant un temps assez prolongé, on obtient presque inmanquablement les deux variétés de colonies. Chose curieuse, ces deux variétés apparaissent d'habitude en nombre sinon égal, au moins comparable, ce qui semble indiquer qu'un équilibre tend à s'établir entre les deux types. Les colonies S sont bombées, luisantes, circulaires; les colonies R sont plates, plus ternes, leur surface est plus rugueuse, leurs contours sont irréguliers. Repiquée en bouillon, la colonie S donne lieu à un trouble homogène, tandis que R donne des flocons qui bientôt se déposent.

La dissociation en R et S est très évidente chez les microbes du groupe coli-typhique, et se montre très nette aussi pour d'autres espèces. On éprouve ainsi l'impression qu'une telle dissociation s'effectue régulièrement dans le monde des bactéries, mais il ne s'ensuit pas qu'il soit facile de déterminer, pour toutes les espèces sujettes à donner des colonies différentes, quelles sont, parmi celles-ci, celles qui respectivement correspondent aux types R et S, tels qu'ils se révèlent par exemple dans le groupe coli-typhique. Etant donné que les bacilles coli et typhique sont très semblables par leur morphologie, on conçoit sans peine que l'aspect des colonies R soit à peu près identique chez les deux espèces, les colonies S de l'une et de l'autre offrant de même entre elles une grande similitude. Mais on ne peut guère s'attendre à des analogies aussi étroites lorsqu'on confronte avec le coli ou le typhique des microbes morphologiquement très différents, telle la bactéridie charbonneuse. Celle-ci manifeste très nettement aussi la tendance à donner des colonies différentes, mais lorsqu'il s'agit de leur appliquer les désignations R et S, par comparaison avec les types ainsi étiquetés du groupe coli-typhique, les auteurs ne sont pas toujours d'accord. Par exemple, il semble bien que les colonies de charbon appelées S par les divers auteurs ne soient pas toujours les mêmes. Dans le cas du charbon, le pro-



blème se complique et l'incertitude augmente du fait que l'on doit tenir compte non seulement de l'aspect des colonies lorsqu'elles sont jeunes, mais aussi de leur aptitude à sporuler, car la sporulation vient modifier très sensiblement l'apparence primitive. Celle-ci peut changer aussi en raison d'un développement microbien secondaire. Or, comme nous le verrons, la composition du milieu nutritif et spécialement sa teneur en calcium exerce souvent une influence fort appréciable sur la sporulation et sur le développement secondaire. L'intervention de facteurs de ce genre doit de toute nécessité être prise en considération, si l'on veut étudier avec précision la morphologie des colonies et l'évolution des cultures.

Le microbe du charbon fut l'un des premiers que l'on considéra attentivement du point de vue de la variabilité. Dans son travail de 1904, Preisz (1) décrit avec une minutieuse exactitude l'aspect de la culture sur gélose ordinaire. Considérons tout d'abord la culture la plus habituelle, la plus normale, celle qui est capable de former des spores en abondance. Au début, la couche microbienne est grisâtre, assez translucide, d'aspect filandreux, sa surface est terne et rugueuse. Lorsqu'on l'examine par transparence, on remarque un aspect spécial, maintes fois signalé, que nous dénommons « aspect givré » et qui se caractérise en ce que le gazon microbien, au lieu de montrer une texture homogène, est parsemé de facettes brillantes plus ou moins serrées, qui scintillent sur un fond translucide avec un éclat cristallin semblable à celui du verre finement craquelé ou d'une vitre couverte de givre. Si l'on ensemece en strie, on constate que souvent la culture tend à s'étendre par les bords, d'où s'échappent bientôt des prolongements en torsades filamenteuses qui s'allongent en s'amincissant, et qui, plus ou moins distantes les unes des autres, se recourbent généralement en panaches, flammèches ou queues de comète.

L'aspect givré est en rapport avec la structure filamenteuse et est d'autant plus remarquable que les filaments sont plus longs et mieux disposés en torsades. Aussi tend-il à se dissiper au fur et à mesure que la culture vieillit et se résout en spores,

(1) PREISZ, Studien über Morphologie und Biologie des Milzbrandbacillus *Centralbl. f. Bakter., Orig.*, 35.



la sporulation s'accompagnant d'une désagrégation des filaments. D'habitude ceux-ci sont en voie de disparition au bout d'un ou deux jours de séjour à l'étuve. Bientôt on ne trouve plus que de rares bâtonnets assez courts, isolés, parmi des spores innombrables. Corrélativement le gazon microbien s'amincit, devient pelliculaire, sa surface blanchit, devient plus lisse et plus humide; il est tout imprégné d'une poussière blanche, assez opaque, constituée par les spores, tandis que les formes végétales se réduisent à des débris.

Par comparaison avec d'autres microbes, on est enclin à considérer cette culture classique du charbon comme appartenant plutôt au type R tout au moins au début du développement, c'est-à-dire lorsque la surface est encore terne et rugueuse. Mais la sporulation ayant pour effet de rendre la surface plus uniforme, plus lisse et plus humide, les caractères habituellement reconnus au type R ne se maintiennent pas, saufs'il s'agit d'une culture ne manifestant qu'une aptitude faible ou nulle à la sporulation. Dans ce cas, l'aspect primitif perdure. Le gazon reste épais, terne, très filamenteux; le fil de platine en ramène une parcelle qui s'étire comme un paquet d'algues et qui se délaie mal dans une gouttelette d'eau. Les torsades filamenteuses ne se dissocient pas aisément. Aussi divers auteurs réservent-ils de préférence la désignation R aux cultures filamenteuses peu ou pas sporogènes, ou qui ne sporulent que très tardivement.

A vrai dire, les cultures normales peuvent, au moins pour certaines colonies, revêtir un aspect un peu différent. On trouve parfois des colonies plus bombées et plus blanches même au début du développement. Par transparence, l'aspect givré existe aussi, mais il est moins net, le dessin des facettes est plus serré et plus confus. Sans être tout à fait lisse, la surface de ces colonies est moins chagrinée, moins terne que chez le type précédent. Elles sont beaucoup moins filamenteuses même lorsqu'elles n'ont encore fourni qu'un nombre modéré de spores. On trouve à ce moment, avec quelques spores, une multitude de bâtonnets bien colorés, trapus, droits, contenant assez souvent une ou deux vacuoles incolores, et qui, au lieu d'être associés en filaments, sont généralement isolés; la sporulation ne se généralise qu'avec une lenteur relative. Les

spores formées par ce type paraissent spécialement volumineuses. Ces colonies sont aptes, au moins autant que les précédentes, à pousser des prolongements en panache. Il semble que certains auteurs leur appliquent la désignation S, mais l'accord est loin d'être unanime. On a l'impression que d'autres auteurs ont appelé S des colonies muqueuses, circulaires, saillantes, lisses et humides que nous retrouverons d'ailleurs plus loin et qui sont constituées de bactéries entourées d'une gangue glaireuse. Hadley (1) qui a beaucoup étudié la dissociation du microbe du charbon reconnaît lui-même que cette question n'apparaît pas encore avec la clarté désirable. Nous n'aborderons donc pas cette discussion relative aux types R et S, et dans la suite de cet exposé nous appellerons A et B les deux types sporogènes ci-dessus signalés : A donnant des colonies filamenteuses plates; les colonies de B étant plus bombées, plus blanches, et formées essentiellement de bâtonnets trapus isolés.

Preisz attirera l'attention sur le fait qu'au bout d'un temps variable, deux ou trois jours, parfois davantage, des colonies souvent nombreuses apparaissent sur la surface jusqu'alors uniforme de la culture. Ce sont de petites élevures à contours nettement délimités, qui trahissent une reprise de la multiplication microbienne après que la sporulation s'est déjà fort étendue. Elles affectent volontiers une forme étoilée ou en rosette. Elles deviennent assez rapidement hyalines et translucides, de sorte que, par transparence, elles se détachent finalement en clair sur le fond plus opaque du gazon. On constate alors qu'elles se dépriment et s'excavent progressivement surtout dans leur partie centrale, tandis que leur bord résiste mieux et apparaît finalement de la sorte comme un anneau saillant, blanc et opaque, circonscrivant un petit cercle clair, lequel simule ainsi une plage de bactériophagie. A ce stade, l'examen microscopique ne décèle plus, au niveau de ces taches claires, que des spores ou des débris. La reviviscence des formes végétatives, qui a permis l'éclosion de telles colonies, n'a donc été que passagère. Parfois les colonies secondaires sont nombreuses au point d'être contiguës dans le gazon microbien qu'elles constellent à la longue de taches claires plus ou moins

(1) HADLEY, Microbic dissociation. *Journ. of infect. diseases*, 40, 1927.



régulières, donnant à la culture un aspect bigarré de carrelage ou de mosaïque.

Les types sporogènes A et B sont tous deux capables de donner lieu à des colonies secondaires de ce genre, que nous appellerons rosettes hyalines. Mais il est fréquent que l'évolution de la culture n'ait pas encore atteint son terme au bout de quelques jours. Plus tard encore peuvent apparaître de nouvelles colonies que Preisz a dénommées tertiaires. Elles deviennent visibles après un délai qui varie selon les souches qu'on observe, et qui dépend aussi, comme il est naturel, des qualités nutritives du milieu. Ce délai est parfois très long, un mois par exemple. Chez les souches bien aptes à les produire, elles se développent en général plus vite si les colonies sont isolées, c'est-à-dire bien nourries, que si l'on aensemencé la surface entière de la gélose. Dans ce cas notamment, elles sont d'habitude moins nombreuses que ne l'étaient les colonies en rosettes hyalines mentionnées ci-dessus. On n'en voit parfois que quelques-unes par tube, soit sur l'emplacement d'une colonie en rosette hyaline précédemment développée, soit sur un autre point de la surface. Elles diffèrent tellement du gazon environnant qu'à première vue on serait tenté de croire qu'elles sont constituées de microbes étrangers introduits par une contamination fortuite. Elles sont très saillantes, blanches et opaques, de forme régulièrement arrondie, et ressemblent ainsi à des boutons compacts qui dans la suite ne manifestent pas de tendance à se lyser et à se flétrir. Elles se distinguent donc nettement des colonies secondaires précédemment signalées, lesquelles, comme il vient d'être dit, sont hyalines, souvent en rosette, et d'habitude se dépriment en s'éclaircissant tout en restant circonscrites par un anneau blanc. Elles s'en distinguent, aussi, et plus nettement encore, par leur signification, ainsi que nous le démontrerons plus loin. Nous verrons que ces colonies sont en réalité l'expression de la mutation qui conduit du type sporogène au type asporogène; celui-ci apparaît en effet au sein de telles colonies. Dans la suite de cet exposé, nous les appellerons « colonies-boutons ».

Pour expliquer l'apparition des colonies secondaires et tertiaires, Preisz admet que, le développement primaire ayant donné des spores, un certain nombre de celles-ci peuvent



germer et engendrer ainsi une nouvelle culture qui s'élève en certains points de la surface, bien que les matériaux nutritifs aient été déjà consommés en bonne partie. L'hypothèse est plausible ; toutefois l'on ne saurait admettre que la germination des spores soit une condition nécessaire à la production des colonies secondaires. En effet, chez des microbes non sporogènes tels ceux du groupe coli-typhique, il n'est pas rare d'observer que le gazon microbien se parsème tardivement de colonies néoformées, arrondies et saillantes, qui elles aussi semblent à première vue être constituées par des microbes étrangers.

Telle est l'évolution sur gélose ordinaire de la culture du charbon classique, c'est-à-dire sporogène. Mais Preisz qui l'a minutieusement décrite ne s'est pas borné à l'étude d'une souche unique. Il en a observé un grand nombre, et a trouvé que certaines d'entre elles ne manifestaient qu'une aptitude sporogène exceptionnellement faible ou même à peu près nulle. Comme on doit s'y attendre, l'aspect de telles cultures se maintient longtemps tel qu'il était au début du développement. Elles restent grises, assez ternes et rugueuses (*rough*), un peu translucides quoique devenant assez épaisses, sans s'opacifier ni blanchir comme le font promptement les cultures sporogènes. Les préparations microscopiques montrent des bâtonnets réguliers, assez allongés, disposés bout à bout en longs filaments qui comme des cheveux se juxtaposent en tresses élégantes, et cet aspect est persistant. Cette texture filamenteuse se perçoit dès qu'au moyen du fil de platine on extrait un peu de la couche microbienne : celle-ci s'étire comme un paquet d'algues qu'on retire de l'eau. Par transparence, l'aspect est très givré. Les colonies isolées deviennent épaisses, gardent un contour assez régulier, et ne manifestent pas, autant que celles de la race sporogène, la tendance à émettre des prolongements en panaches. Elles sont nettement moins aptes que les cultures sporogènes à produire des colonies secondaires ou tertiaires. Preisz signale avoir fréquemment observé des souches très peu sporogènes, mais n'en avoir pas trouvé qui fussent absolument asporogènes.

D'où proviennent ces souches asporogènes ou tout au moins faiblement sporogènes ? Il est bien naturel de penser qu'elles dérivent du type primitif dont la faculté sporogène s'est simple-

ment affaiblie en raison de l'entretien prolongé sur les milieux artificiels. C'est à Eisenberg (1) que l'on doit d'avoir élucidé ce point. Il recueillit cette importante donnée que la plupart des cultures de charbon qu'on entretient au laboratoire contiennent les deux types de germes, et qu'il suffit, pour se les procurer à l'état pur, de recourir à la méthode habituelle d'isolement sur gélose. On obtient des colonies séparées qui se différencient nettement au bout de quelques jours, les unes fort aptes à s'entourer secondairement d'expansions en panaches ou en bordure plus ou moins continue et qui bientôt s'amincissent en blanchissant et en devenant plus luisantes surtout vers leur centre, les autres grises, bleuâtres, restant plus translucides quoique s'épaississant, à surface terne et mate, un peu rugueuse, gardant un aspect filandreux et givré par transparence (type rough caractérisé). Le repiquage des premières fournit la race sporogène typique, celui des autres donne la variété asporogène ou très peu sporogène avec les caractères morphologiques et culturels ci-dessus rappelés. Par ce procédé Eisenberg obtint des souches absolument asporogènes, c'est-à-dire stérilisables par le chauffage à 65°-70°, contrôle qui seul permet d'affirmer l'absence totale de spores. Ces souches se maintiennent telles après de nombreux repiquages et même après des passages en série chez le cobaye; elles se montrèrent donc très stables, sans manifester de tendance à retourner au type sporogène primitif.

Mais entre les deux types extrêmes et parfaitement caractérisés, sporogène et asporogène, on peut trouver, comme Eisenberg eut soin de le mentionner, des types intermédiaires. Parmi les colonies séparées que la technique de l'isolement permet d'étudier, on en trouve souvent qu'il est malaisé de classer, et l'examen microscopique corrobore l'impression qu'elles représentent une véritable transition, qu'elles se composent de germes en voie d'évolution. Elles sont encore capables de fournir des spores, mais n'en produisent que tardivement et en nombre minime. A côté de ces spores on trouve des bâtonnets isolés mais aussi des filaments très peu sporifères qui persistent longtemps et ressemblent aux filaments des cultures asporo-

(1) EISENBERG. *Centralbl. f. Bakteriologie*, **63**, 1912 et **73**, 1914.

gènes. Il apparaît clairement ainsi que la transformation du type sporogène en type asporogène s'accomplit graduellement et par étapes. Eisenberg signale encore qu'à condition de les pratiquer à des intervalles rapprochés, de préférence quotidiennement, les repiquages répétés d'une culture sporogène peuvent, au bout d'un délai assez court, conduire à l'obtention d'une culture asporogène. Cela se comprend aisément, les spores réclamant quelque temps pour germer, tandis que le type asporogène encore jeune pousse sans retard avec luxuriance et peut ainsi, dans de telles conditions, supplanter le type sporogène. D'autre part, une fois apparu, le type asporogène est très peu réversible tandis que la race sporogène tend incessamment à se dissocier pour engendrer des germes asporogènes.

Complétons ces données en signalant dès à présent un fait sur lequel nous reviendrons plus loin. Pour obtenir presque à coup sûr la race asporogène en partant d'une culture sur gélose du type sporogène normal, il suffit de pratiquer l'isolement aux dépens d'un peu de matière microbienne prélevée au niveau d'une de ces colonies saillantes, blanches et opaques, apparaissant tardivement sur les cultures sporogènes et que nous dénommons colonies-boutons. On obtient ainsi, à côté de colonies encore sporogènes, de nombreuses colonies asporogènes. Ceci nous indique déjà que les colonies-boutons offrent beaucoup d'intérêt pour l'étude de la variabilité du microbe du charbon. Rappelons à ce propos que c'est également au niveau de colonies secondaires d'apparition tardive que s'accomplit le phénomène de mutation observé par Neisser et Massini chez un colibacille dénommé par ces auteurs *coli mutabile*.

En résumé, les cultures de charbon entretenues sur les milieux usuels sont le plus souvent hétérogènes, notamment en ce que le type sporogène et le type asporogène s'y trouvent mélangés. Si l'on tient compte en outre de l'existence fréquente de types intermédiaires et du fait que des colonies secondaires d'apparence variée peuvent se développer, on comprend que les cultures de charbon revêtent très souvent un aspect singulièrement bigarré. Rien d'étonnant dès lors à ce que certains auteurs aient cru devoir distinguer tellement de colonies ou de variétés différentes qu'il est parfois malaisé de se retrouver dans la complexité de ces subtiles descriptions.



## II. — CULTURE DE LA RACE SPOROGÈNE SUR GÉLOSE OXALATÉE ET SUR GÉLOSE CALCIFIÉE.

Étant donnée une culture de charbon entretenue depuis quelque temps au laboratoire, mais encore bien virulente, recherchons comment elle se comportera sur les milieux nutritifs gélosés, soit débarrassés de leur calcium soluble par addition de 1 à 2 p. 1.000 d'oxalate neutre de soude, soit enrichis en calcium par addition d'un peu de solution de  $\text{CaCl}_2$  à 1 p. 100.

Nous venons de rappeler que sur gélose ordinaire les cultures de charbon ont tendance à donner naissance à la race asporogène et que cette mutation semble s'accomplir surtout au niveau des colonies saillantes d'apparition tardive que nous appelons colonies-boutons. Pratiquons donc l'isolement aux dépens d'une culture présentant de telles colonies. Parmi les colonies isolées qui se développent nous trouvons les deux types bien tranchés; les colonies du type asporogène, plus épaisses et plus ternes, restent longtemps filamenteuses et gardent une forme assez régulière, tandis que les colonies du type sporogène, plus plates, à surface plus humide, projettent souvent des expansions et blanchissent bientôt par suite de la production de spores. Repiquons le type sporogène pour l'étudier au point de vue de l'influence du calcium.

La gélose communément employée dans les laboratoires, et qu'on obtient en gélosant le bouillon peptonisé, contient toujours une dose appréciable de calcium. En effet, le bouillon même nettement alcalinisé n'en est pas exempt, la gélose d'autre part en renferme une proportion assez forte. Très généralement donc, les microbes entretenus sur gélose subissent nettement l'influence des sels calciques.

Dans des tubes contenant environ 6 cent. cubes de gélose, on introduit XXV gouttes de solution stérile d'oxalate sodique à 1 p. 100. On fond par chauffage dans la vapeur à  $100^\circ$ , on mélange soigneusement et on couche les tubes en position inclinée. Ces tubes sont de la sorte oxalatés à environ 2 p. 1.000, on s'assure que l'oxalate est en excès. D'autres tubes sont fondus, après quoi on y introduit V gouttes de solution stérile de  $\text{CaCl}_2$  à 1 p. 100. On agite et laisse refroidir en position inclinée.

On ensemente la souche sporogène sur chacun de ces milieux. Dans la suite, on entretient ces deux cultures, calcifiée et décalcifiée, en les transplantant respectivement toujours sur milieu identique. On pratique ainsi, en sept mois environ, une douzaine de repiquages en série. Les cultures restent trois jours à l'étuve, puis sont maintenues à la température du laboratoire.

Après un nombre modéré de repiquages, des différences sensibles apparaissent entre la culture sur milieu oxalaté et celle qui contient du calcium, différences qui s'accroissent au cours des repiquages ultérieurs. Sur oxalate, le gazon microbien s'aminçit au bout de quelques jours, tend à se transformer en une pellicule blanche et opaque, constituée presque exclusivement de spores. Sur gélose calcifiée, la couche microbienne reste plus grise, plus grumeleuse, moins aisément dissociable dans un peu d'eau, la sporulation est moins étendue que sur milieu oxalaté; les formes végétatives persistent beaucoup plus longtemps, les bâtonnets manifestent une tendance remarquable à s'associer en filaments souvent longs. Des colonies secondaires hyalines en rosettes, et qui dans la suite se flétrissent en s'éclaircissant, peuvent apparaître aussi bien sur milieu oxalaté que sur milieu calcifié, mais, fait essentiel, les colonies tardives, saillantes et opaques, du type bouton, ne se montrent que sur la gélose calcifiée. Considérant la signification ci-dessus mentionnée des colonies-boutons relativement à la genèse de la race asporogène, nous pouvons, en conséquence, présumer déjà que l'apparition de cette variété est favorisée par le calcium.

### III. — CONSTITUTION DE LA CULTURE ENTRETENUE SUR GÉLOSE OXALATÉE.

Ayant ainsi acclimaté, pendant un temps suffisant, la souche sporogène à la gélose soit oxalaté, soit calcifiée, procédons à l'inventaire des germes peuplant respectivement ces deux milieux. Recourons dans ce but à la technique de l'isolement sur gélose ordinaire et étudions pour commencer les colonies séparées obtenues aux dépens de la culture sur oxalate. On en distingue deux types. Les plus nombreuses (type A) sont assez plates, à surface terne et rugueuse tout au moins au début,

d'aspect très givré par transparence; elles tendent à s'élargir en s'entourant d'une mince collerette. Les colonies du second type (B), moins nombreuses, sont plus blanches, un peu plus bombées, plus lisses et moins givrées; elles donnent plus volontiers des expansions en panache. Les tubes d'isolement ayant séjourné deux jours à l'étuve, on repique des colonies de chaque type, d'une part sur gélose oxalatée, d'autre part sur gélose calcifiée. Les cultures obtenues sont entretenues par repiquage en série sur milieu identique. Pour l'examen microscopique, on colore par la fuchsine phéniquée à chaud jusqu'à ébullition, rince à l'eau puis à l'alcool pendant deux ou trois minutes, puis recolore à froid pendant environ dix minutes par une solution à 0,5 p. 100 de bleu de méthylène dans l'eau distillée. Comme on sait, de telles préparations montrent les spores en rouge, les bâtonnets en bleu.

TYPE A. — Parfois dès le premier ensemencement, parfois seulement après quelques repiquages en série, les microbes provenant de la colonie A se comportent très différemment selon qu'ils poussent sur oxalate ou sur milieu calcifié. En effet, c'est vis-à-vis du type A que l'influence du calcium est le plus évidente. Sur oxalate, la culture luxuriante développée au bout d'une douzaine d'heures est constituée tout d'abord de filaments. Mais la sporulation est très précoce, très étendue déjà après un jour, de sorte qu'un peu plus tard on ne trouve plus, parmi la multitude des spores, que de rares bâtonnets isolés et assez courts, dont la colorabilité a faibli. Après deux ou trois jours on peut bien constater l'apparition de petites élevures hyalines plus ou moins nombreuses (colonies secondaires type rosette) mais elles se flétrissent bientôt; cette légère reprise de la végétation est transitoire, les bâtonnets néoformés finissent par sporuler ou se lyser. Désormais la couche microbienne, réduite à un enduit pelliculaire assez adhérent qui par délayage libère une poussière blanche de spores, ne subit plus aucune modification. Figée désormais, vouée à l'immobilité, elle reste blanche, luisante, lisse, opaque, sauf qu'elle peut être constellée de taches translucides plus ou moins nombreuses résultant de l'affaissement et de la clarification des colonies secondaires hyalines. On n'y observe pas dans la suite la for-



mation de ces colonies saillantes, blanches et bien circonscrites que nous nommons colonies-boutons, et le microscope n'y décèle pas de néoformation appréciable de filaments.

Le tableau est tout autre lorsque cette même souche A se développe sur gélose calcifiée. Après quelques passages sur ce milieu, parfois même dès le premier, la sporulation est nettement enrayée. Sans être supprimée, elle est moins précoce et moins complète. Tandis que sur gélose oxalatée la sporulation est quasi intégrale au bout de quelques jours, on trouve à ce moment sur gélose calcifiée, parmi les spores, de nombreux bâtonnets assez épais, manifestant une tendance prononcée à s'associer en filaments, se colorant en bleu d'une façon plus intense que leurs congénères, ce qui indique qu'ils sont plus récents, qu'ils sont nés d'un développement secondaire. Corrélativement à la persistance des formes végétatives et à la discrétion de la sporulation, le gazon microbien reste plus épais, plus grumeleux, plus translucide et grisâtre, sa surface se maintient terne et rugueuse au lieu de revêtir l'aspect lisse et humide. Les préparations sur lame des cultures sur gélose oxalatée et sur gélose calcifiée, traitées exactement de la même façon (fuchsine, alcool, bleu) se distinguent déjà à l'œil nu. Ne contenant plus guère que des spores, la préparation de la souche oxalatée est rouge, l'autre est bleuâtre. Une différence importante consiste en ce que sur gélose calcifiée apparaissent très fréquemment des colonies nouvelles du type bouton. Parfois elles se montrent assez tardivement et en nombre restreint de façon à se détacher très visiblement sur le fond de la culture. Parfois elles surviennent plus vite et sont si nombreuses qu'elles ne se distinguent pas nettement du gazon environnant dans lequel elles tendent à se confondre, de telle sorte qu'alors on ne reconnaît plus aussi aisément le développement secondaire du développement primaire. Lorsqu'on repique en strie ou mieux encore lorsqu'on ensemence discrètement de façon à obtenir des colonies séparées, l'apparition des colonies-boutons est, en général, nettement favorisée, ce qui se conçoit aisément, car en pareil cas les matériaux nutritifs ne sont pas aussi promptement épuisés, le milieu reste plus propice à la néoformation des germes. Dans ces conditions les colonies néoformées apparaissent souvent vers le bord de la colonie primitive,

qu'elles dépassent en grandissant. L'examen au microscope de ces colonies-boutons y décèle des bâtonnets d'habitude assez courts, mais remarquables par leur épaisseur tout à fait inusitée, et qui fréquemment sont disposés bout à bout en courts filaments. Au fur et à mesure que la colonie grandit, apparaissent généralement aussi des filaments plus longs, composés d'articles moins épais, plus normaux, de sorte que l'aspect de la préparation évolue vers celui des chevelures caractéristiques de la variété asporogène ou peu sporogène. Le microscope confirme ainsi l'impression que les colonies secondaires du type bouton sont par excellence le siège de la transformation engendrant la race asporogène et que les très gros éléments signalés ci-dessus représentent une étape de cette évolution. Comme il a été mentionné plus haut, il suffit d'ailleurs de transplanter sur une nouvelle gélose calcifiée un peu d'une telle colonie pour obtenir aisément la race filamenteuse peu sporogène. Il arrive parfois qu'autour d'une colonie-bouton on remarque une zone étroite de clarification, comme si cette colonie émettait une substance lytique. .

Des cultures où des colonies-boutons se sont formées donnent par repiquage des cultures-filles qui peuvent elle-mêmes former ces mêmes colonies. Toutefois, au bout de quelques repiquages sur milieu calcifié, l'aptitude à les produire s'atténue, tandis que la souche revêt de plus en plus nettement les caractères de la souche filamenteuse asporogène. Cela se comprend aisément. La race asporogène est l'aboutissement de la transformation dont la colonie-bouton est le siège et l'indice. Dès que cette évolution se parachève, les germes asporogènes caractéristiques de la colonie-bouton, étant prépondérants désormais, constituent d'emblée par repiquage le développement primaire, sur lequel une culture secondaire, à supposer qu'elle pût encore s'effectuer, ne se distinguerait plus guère puisqu'elle serait formée de germes identiques.

Maintenues sur milieu calcifié, de telles cultures parviennent bientôt au terme de leur évolution, c'est-à-dire deviennent véritablement asporogènes. Désormais elles sont stérilisables par le chauffage à 65°, 70°, même après une longue conservation. Nous les appellerons A A. Dans ces conditions leur aspect de même que leur morphologie s'est nettement stabilisé.

Elles sont grisâtres et translucides, ternes, très filandreuses, très givrées par transparence et restent épaisses beaucoup plus longtemps que la race sporogène. Les filaments associés en tresses élégantes sont composés d'articles devenus sensiblement plus minces que les bâtonnets de charbon ordinaire. Cette minceur relative des filaments, cette culture en longues chevelures sont les caractéristiques importantes de la race asporogène AA obtenue à l'intervention du calcium. De plus, cette race ne produit jamais de colonies secondaires hyalines en rosettes susceptibles de se clarifier, lesquelles ne peuvent apparaître que sur les cultures sporogènes.

Il n'est pas sans intérêt de déterminer approximativement la dose d'oxalate sodique qui suffit à empêcher l'évolution du type A vers le type AA. On chauffe au bain-marie une série de tubes contenant environ 7 cent. cubes de bouillon gélosé, et l'on mélange à ces géloses fondues des doses variables d'oxalate à 1 p. 100. On trouve par exemple qu'il suffit de VI à VIII gouttes d'oxalate pour que le type sporogène A ultérieurement ensemencé atteste le manque de calcium, c'est-à-dire subisse la sporulation intégrale sans engendrer les colonies-boutons secondaires qui conduisent au type asporogène. Il va sans dire que si dans un tube oxalaté de la même façon et refondu on neutralise l'oxalate par un léger excès de chlorure calcique, la gélose ainsi recalcifiée redevient propice à la métamorphose du charbon.

Entre ces termes extrêmes, race A activement sporogène qui se maintient telle sur gélose oxalatée, race AA asporogène apparue grâce au calcium, existent des intermédiaires, l'évolution comportant des étapes qu'il est aisé de saisir. Partant de la souche A développée sur oxalate, on lui fait subir, en l'espace d'une vingtaine de jours par exemple, quatre ou cinq passages sur gélose calcifiée, et l'on pratique alors l'isolement. Dans ces conditions la souche A toujours maintenue sur oxalate donne des colonies isolées identiques, uniformément très sporogènes, tandis que la culture passée sur gélose calcifiée donne des colonies séparées qui ne sont pas toutes pareilles. Certaines d'entre elles, parfaitement semblables à celles que fournit la culture oxalatée, représentent le germe sporogène non encore modifié; bientôt elles s'amincissent et blanchissent du fait de la



sporulation. D'autres, que l'on reconnaît à ce qu'elles gardent l'aspect filandreux et givré et tendent à s'épaissir peu à peu, ont nettement les caractères du type asporogène; entre ces colonies si distinctes on observe de nombreuses transitions, on trouve des colonies intermédiaires qu'il convient d'étudier en les repiquant d'une part sur gélose oxalatée, d'autre part sur gélose calcifiée. Sur celle-ci, l'évolution vers le type asporogène à longs filaments minces se poursuit. Sur gélose oxalatée, on observe en quelque sorte un retour en arrière : la sporulation, qui se restreignait sous l'influence du milieu calcifié, reprend avec vigueur. Le calcium favorisait nettement la propension des germes à s'associer en filaments : cette tendance cesse de se manifester. Moins elle a été profonde, plus aisément s'efface, dès qu'on reporte sur oxalate, l'impression produite par le séjour éphémère sur milieu calcifié. De telles cultures en voie d'évolution, dont la faculté sporogène persiste quoique plus ou moins déprimée, peuvent être repiquées, soit telles quelles, soit après avoir été chauffées vers 65°, c'est-à-dire qu'on ensemente, soit des formes végétatives, soit uniquement des spores. Dans ces conditions, chose assez naturelle, les spores restituent surtout le type peu évolué, fortement sporogène, affectant la forme de bâtonnets assez gros et souvent isolés, tandis que l'ensemencement des formes végétatives assure le maintien du type évolué qui se présente en filaments longs et assez minces, peu enclins à sporuler. Fait remarquable, le passage graduel du type sporogène au type asporogène comporte une baisse, également graduelle, de la virulence; nous reviendrons sur ce point.

Il convient de signaler encore que le processus de transformation ici décrit ne semble pas pouvoir s'accomplir toujours sans que le microbe en souffre. L'examen microscopique révèle parfois, à cet égard, des faits assez curieux. Comme nous venons d'y insister, le type A venant de gélose oxalatée tend, au cours des passages sur gélose calcifiée, à s'amincir en devenant très filamenteux. Mais on constate parfois, durant cette période d'adaptation, un phénomène de fragmentation consistant en ce que les minces bâtonnets placés bout à bout se résolvent en un alignement de grains ressemblant à de petits cocci un peu allongés. Il s'agit d'une sorte de lyse se trahissant aussi

en ce que le gazon microbien devient remarquablement translucide. Mais comme à ce stade de l'évolution la faculté sporogène tout en s'atténuant persiste encore, il peut arriver qu'au bout d'un certain temps ces granulations cocciformes se transforment en spores, lesquelles sont alors d'une petitesse extraordinaire. Ce fait s'observe sur gélose calcifiée, tandis que le repiquage correspondant sur gélose oxalatée donne des spores de dimensions normales.

Reprenons maintenant le type AA bien évolué sous l'action du calcium, et qui se présente en longues chevelures asporogènes. Repiquons une telle culture sur gélose calcifiée et sur gélose oxalatée. Les deux cultures se ressemblent beaucoup, montrant les mêmes longs filaments exempts de spores. Cependant l'on constate, tout au moins après quelques passages, que la culture sur oxalate résiste mieux à la conservation prolongée que la culture sur calcium. Si l'on attend trop longtemps, un mois ou deux par exemple, pour repiquer celle-ci, elle risque de ne plus repousser tandis que la vitalité de la culture sur oxalate s'est maintenue. Cela tient à ce qu'il s'y forme lentement quelques rares spores. A ce moment, elle n'est plus stérilisable à 65° comme l'est la culture correspondante sur calcium. Repiquons sur oxalate une telle suspension chauffée, c'est-à-dire ne contenant plus que des spores, de la culture développée sur milieu oxalaté. Nous obtenons ainsi une culture dont l'aptitude sporogène est beaucoup plus prononcée qu'antérieurement, mais dont les caractères morphologiques spéciaux ont persisté, c'est-à-dire qui se présente toujours en longues chevelures composées d'articles assez minces. Les dimensions des spores sont en rapport avec la forme des articles : elles sont remarquablement étroites et assez allongées. Elles perpétuent les caractères propres de la variété, elles ont elles-mêmes un aspect particulier. On trouve en somme que le retour sur milieu oxalaté a finalement déterminé la réapparition des spores sans effacer l'impression produite sur la morphologie par le séjour prolongé sur milieu calcifié. Ayant recouvré la faculté sporogène, la culture reprend aussi l'aptitude à donner des colonies secondaires hyalines, lesquelles, nous l'avons signalé, ne se montrent que dans les cultures sporogènes. Bien entendu, cette culture qui a récupéré l'aptitude sporogène grâce à l'oxalate

produit beaucoup moins de spores si on la reporte sur gélose calcifiée que si on l'ensemence sur gélose oxalatée.

**TYPE B.** — Nous avons vu plus haut que lorsqu'on soumet à l'isolement la culture sporogène initiale de charbon, accoutumée à l'oxalate, on obtient deux sortes de colonies, l'une A que nous venons de considérer, l'autre B, ces colonies B étant un peu plus bombées, plus blanches et moins givrées, très aptes à fournir des prolongements recourbés en panaches. Des colonies de ce genre sont repiquées, les cultures obtenues sont entretenues parallèlement sur gélose oxalatée et calcifiée, en même temps que le type A ci-dessus étudié.

Disons immédiatement que l'influence du calcium, si évidente sur le type A, l'est beaucoup moins sur le type B. Considérons en premier lieu les deux types A et B maintenus sur oxalate. Comme nous l'avons signalé, le type A, nettement filamenteux au début de la croissance, se résout, sur oxalate, très rapidement en spores. Sur ce même milieu le type B pousse plus volontiers en bâtonnets isolés, épais, trapus, présentant souvent une ou deux vacuoles claires très évidentes. Des spores apparaissent bientôt, mais la sporulation ne se généralise pas très promptement, de sorte qu'après deux ou trois jours, tandis que A ne montre plus guère que des spores, on trouve encore, dans la culture de B, parmi des spores souvent un peu plus volumineuses que celles de A, de nombreux gros bâtonnets isolés. Dans la suite, à vrai dire, la sporulation progresse et finit par être quasi totale. La souche B est apte, au moins autant que la souche A, à donner les colonies secondaires hyalines déjà décrites et qui ultérieurement se résolvent en taches claires en subissant la sporulation.

Sans être nulle, l'influence du calcium n'est pas assez prononcée pour modifier considérablement ce tableau. Notamment, son influence antisorulante quoique perceptible est beaucoup moins nette et moins régulièrement observable. Il semble même que la souche B puisse réagir contre elle au point d'y devenir insensible. Aussi la culture sur gélose calcifiée ne permet-elle pas d'obtenir, aux dépens de B, une race asporogène. A vrai dire, lorsqu'on procède à l'inventaire des germes peuplant la culture de B sur oxalate, on peut trouver entre eux

des inégalités quant à la promptitude avec laquelle la sporulation s'effectue. Si l'on choisit ceux dont l'aptitude sporogène est le moins prononcée et si on les cultive comparativement sur oxalate et sur calcium, l'influence habituelle de ce métal se retrouve, les spores apparaissent plus nombreuses sur oxalate. Chez le type B, on constate également que le calcium favorise l'association en filaments; mais cet effet est moins net que chez A. On peut néanmoins conclure, même pour ce qui concerne B, que le calcium agit dans une mesure appréciable comme facteur de pléomorphisme. En sa présence, on constate une tendance du microbe à affecter des formes très variées, les unes courtes et grosses, les autres assez minces. Notons en outre que sur gélose calcifiée le développement est d'habitude plus prolongé, on observe une néoformation d'éléments associés en chapelets, très fortement colorables, la culture est plus grumeleuse, moins aisément dissociable.

Quels sont, en réalité, entre les types A et B, les rapports de filiation? C'est une question à laquelle nous avouons ne pas pouvoir répondre avec toute la précision désirable. Comme nous l'avons mentionné, lorsqu'on ensemence sur gélose une trace de la culture originelle et typiquement sporogène de charbon, et qu'on procède ensuite à de nombreux repiquages toujours sur oxalate, on obtient finalement les deux types. En conséquence, il nous semble probable que même en l'absence de calcium ils peuvent dériver l'un de l'autre, bien qu'ils soient susceptibles, lorsque la technique de l'isolement les a fournis à l'état pur, de garder leurs caractères propres pendant une période de temps fort appréciable mais dont, n'ayant pu prolonger davantage nos recherches sur ce point, nous ne pourrions définir exactement la durée. Nous avons l'impression assez nette que sur milieu oxalaté ou calcifié A peut procéder de B, plutôt que l'inverse. Quant à l'évolution de A, nous avons suffisamment insisté sur le fait qu'en milieu calcifié ce type tend à se transformer en la variété asporogène AA, laquelle ne semble pas réversible, sauf qu'elle peut reprendre la qualité sporogène si on la reporte et l'entretient assez longtemps sur milieu oxalaté.



#### IV. — CONSTITUTION DE LA CULTURE ACCOUTUMÉE A LA GÉLOSE CALCIFIÉE.

Comme il est dit plus haut, nous avons, au début de nos recherches, cultivé pendant longtemps le charbon sporogène classique, d'une part sur gélose oxalatée, d'autre part sur gélose calcifiée. Nous avons consacré les pages qui précèdent à l'étude de la culture obtenue sur oxalate.

Quant à la souche acclimatée à la gélose calcifiée, elle fournit par isolement deux types de colonies qu'il nous sera facile d'identifier, car nous les connaissons déjà. L'une est le type B, parfaitement semblable au type B trouvé dans la culture oxalatée et que nous venons de considérer; nous ne répéterons donc pas sa description. Rien d'étonnant à ce que ce type B s'obtienne aussi aux dépens de la culture sur milieu calcifié, puisque, comme nous l'avons signalé, il ne subit que faiblement l'influence du calcium et semble même y devenir bientôt insensible en s'y adaptant.

Le second type, offrant avec le précédent le contraste le plus tranché, se montre, comme on pouvait le présumer, tout à fait identique au type AA, dont l'aspect en longues chevelures asporogènes nous est familier, puisque nous avons régulièrement obtenu cette race en transportant sur gélose calcifiée le type A extrait de la culture de charbon maintenue sur oxalate. Quant au type A sporogène, si abondant sur oxalate, la culture longtemps entretenue sur gélose calcifiée ne le fournit plus, et c'est bien naturel, puisque le calcium a précisément pour effet de transformer A en AA.

Au point de vue de la dissociation, l'entretien prolongé du charbon sporogène sur gélose calcifiée produit donc des effets extrêmement manifestes, puisqu'il scinde la souche primitive sporogène en deux races aussi dissemblables que possible, affectant l'aspect, l'une (B), de bâtonnets assez courts, trapus, sporogènes et généralement isolés, l'autre (AA), de longs filaments asporogènes.

L'opposition entre les deux types est tout aussi frappante pour ce qui concerne la virulence, le type B étant très virulent, le type AA étant absolument inoffensif pour le cobaye et pou-

vant être inoculé à haute dose sans provoquer d'œdème ni, il convient de l'ajouter, sans conférer à l'animal la résistance vis-à-vis du type B. Rappelons au surplus que le type A fourni par la culture sur oxalate est, comme le type B, fortement pathogène, de telle sorte qu'un excellent moyen, dans la pratique, de conserver au charbon à la fois sa virulence et sa faculté sporogène, c'est de l'entretenir sur gélose oxalatée.

#### V. — LA MODIFICATION VISQUEUSE DU CHARBON.

Divers auteurs ont signalé que le microbe du charbon s'entoure parfois d'une gaine de matière glaireuse qui sans doute est une gomme et qui confère aux colonies un aspect visqueux et même huileux. Le gazon microbien peut être tellement gorgé de cette substance qu'il devient très épais, très saillant et ressemble à un sirop blanchâtre qui finit par couler sur la surface du milieu. La substance constitutive de la gaine prend une nuance rougeâtre par le bleu de toluidine, de sorte que, traités par ce colorant, les articles engainés apparaissent au microscope comme de gros tronçons rouges dans l'axe desquels on distingue parfois assez malaisément le bâtonnet lui-même, qui se teint en bleu.

L'étude du phénomène montre que la race filamenteuse asporogène est particulièrement apte à le manifester, et que le séjour prolongé du microbe en milieu de culture liquide (bouillon) est nettement propice à son apparition.

Toutefois les races asporogènes ou faiblement sporogènes peuvent, après des repiquages assez nombreux, devenir visqueuses même sur gélose, à condition que celle-ci soit oxalatée; le phénomène ne s'observe pas sur gélose ordinaire. Pour le faire apparaître, le mieux est de pratiquer, à des intervalles assez éloignés, quelques repiquages du charbon asporogène en bouillon, puis d'ensemencer sur gélose oxalatée. Si l'on remarque qu'au bout de deux ou trois jours la culture prend un aspect humide et légèrement visqueux, on procède à l'isolement sur gélose oxalatée. Des colonies apparaissent dont certaines sont plates et assez sèches; d'autres, par contre, deviennent bientôt très saillantes, luisantes et glaireuses. On repique celles-ci sur gélose oxalatée; après quelques repi-

quages, de préférence fréquents, sur ce même milieu, le caractère visqueux s'accroît; on obtient une culture filante d'aspect huileux. Par contre, la culture reprend assez promptement l'aspect normal si on la reporte sur gélose calcifiée. L'influence très favorisée que l'oxalate exerce sur la production de la matière glaireuse est utile à connaître pour les auteurs qui se proposent de poursuivre l'étude de la nature chimique de cette substance. Grâce à l'oxalate, il est facile d'obtenir une race présentant à un haut degré, à titre permanent, le caractère visqueux. Si l'on part d'une souche encore virulente, la race visqueuse obtenue peut se maintenir telle sur oxalate après avoir passé par l'organisme du cobaye.

#### EXPLICATION DES FIGURES

FIG. 1, 2, 3 et 4. — L'isolement pratiqué aux dépens du charbon sporogène typique, longtemps entretenu sur gélose oxalatée fournit des colonies isolées de type A et de type B, lesquelles sont repiquées soit sur gélose oxalatée, soit sur gélose calcifiée. Après trois jours à l'étuve, ces cultures sont examinées au microscope. La figure 1 représente la culture sur gélose oxalatée. La sporulation y est déjà quasi complète. Sur gélose calcifiée (fig. 2) se manifeste déjà la tendance à la néoformation de filaments; la sporulation est modérée. Les figures 3 et 4 montrent les cultures, âgées de trois jours, du type B sur gélose soit oxalatée, soit calcifiée. On voit que le calcium n'agit pas aussi nettement sur B que sur A. Cependant il diminue visiblement la sporulation et détermine une certaine tendance à l'association des bâtonnets en filaments.

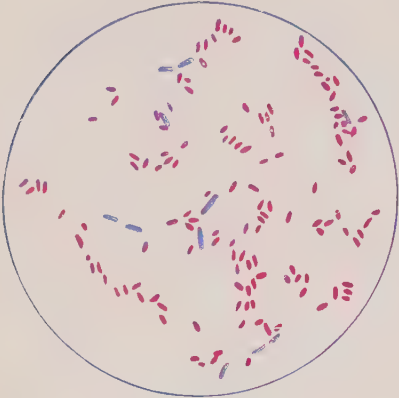
FIG. 5 et 6. — Les cultures de type A mentionnées ci-dessus sont conservées trois semaines. La figure 5 (culture sur gélose oxalatée) ne montre plus que des spores. En 6 (culture sur gélose calcifiée) on trouve, à côté de spores assez rares, de grosses formes qui représentent un stade de l'évolution vers le type filamenteux asporogène A A. Sur certaines préparations analogues, ces grosses formes sont encore plus volumineuses; ces très gros éléments se rencontrent notamment dans les colonies secondaires opaques, blanches et saillantes (type bouton) qui apparaissent tardivement (parfois seulement après quinze à trente jours), à la surface des géloses calcifiées qu'on aensemencées de type A venant de gélose oxalatée.

FIG. 7 et 8. — Cultures âgées de trois jours, de la même souche A, après quelques passages sur gélose oxalatée (fig. 7) ou calcifiée (fig. 8). Sur gélose calcifiée, la transformation de A en type asporogène A A est réalisée.

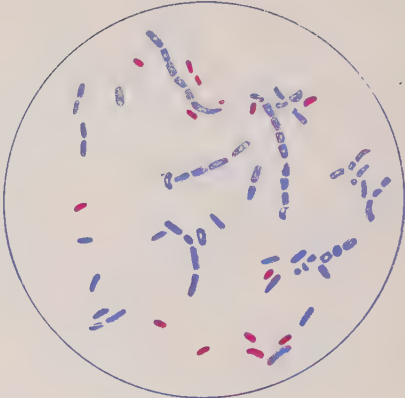
FIG. 9. — Type A A maintenu plus longtemps encore sur gélose calcifiée. Les filaments tendent à s'amincir.



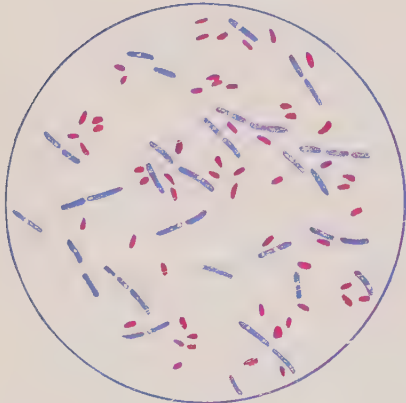




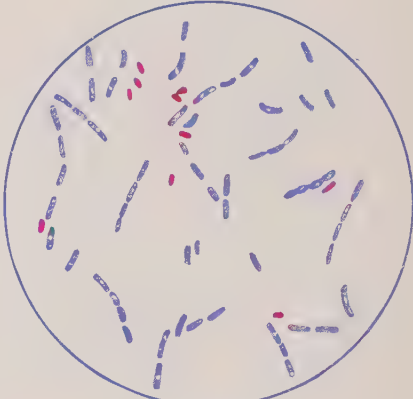
1



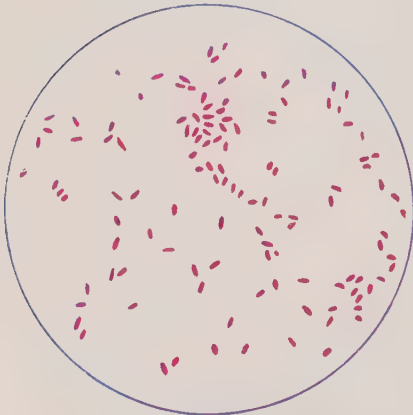
2



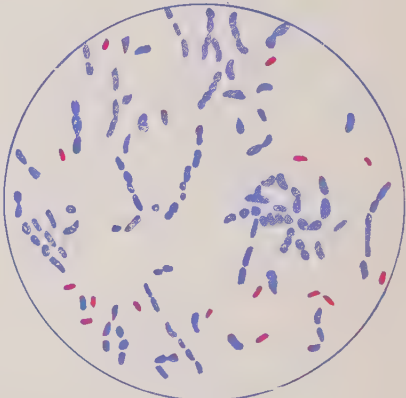
3



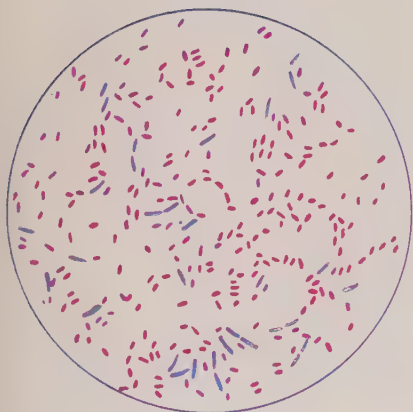
4



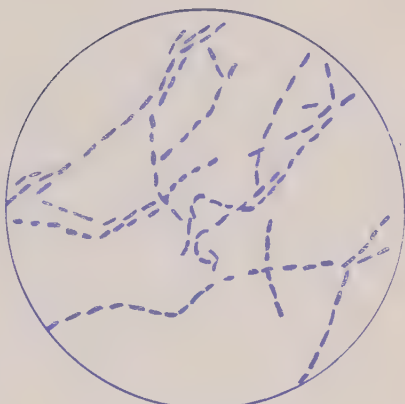
5



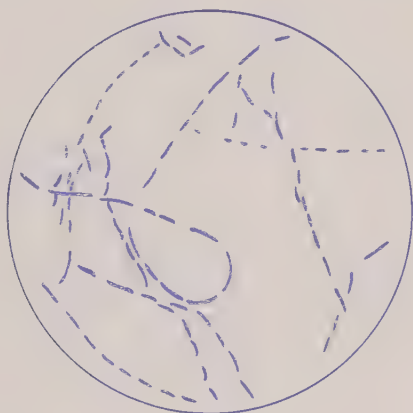
6



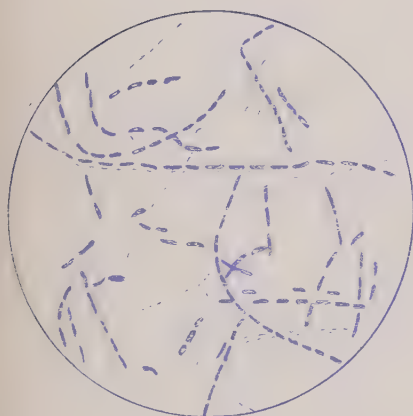
7



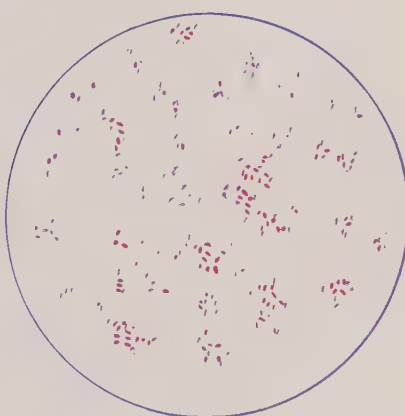
8



9



10



11





FIG. 10 et 11. — Lors des premiers passages, sur gélose calcifiée, du type A venant de gélose oxalatée, c'est-à-dire lorsque le microbe s'adapte au calcium, le gazon microbien manifeste parfois une certaine tendance à se lyser. Les préparations montrent alors des éléments extrêmement minces, généralement placés bout à bout, parfois assez allongés, parfois plus courts, d'aspect cocciforme. La figure 10 représente une telle culture encore toute jeune. La même culture, conservée très longtemps, a fini par sporuler, les éléments cocciformes se convertissant en spores extrêmement petites (fig. 11). La préparation montre ainsi des spores de dimensions variables.

# INFLUENCE DU CALCIUM SUR LES CARACTÈRES DES ESPÈCES MICROBIENNES

par PAUL BORDET.

(AVEC PLANCHES II ET III, EN COULEURS)

(*Institut Pasteur de Bruxelles.*)

Mieux susceptibles en général que les êtres supérieurs de s'adapter aux modifications de l'ambiance, les êtres microscopiques se prêtent particulièrement à l'étude de l'influence exercée par le milieu; mais cette appropriation peut comporter des perturbations de la physiologie, voire de la morphologie microbienne, c'est-à-dire qu'elle est parfois de nature à compliquer le travail de classification. Lorsqu'on compare les espèces microbiennes en vue soit de les identifier, soit de les distinguer, il importe de les cultiver dans les mêmes conditions en procédant à l'étude systématique de leurs propriétés diverses. Est-il besoin de rappeler notamment l'importance de la nature des substances nutritives organiques : sucres, dérivés azotés, composés plus complexes tels que les albuminoïdes ou bien encore l'influence des substances toxiques, laquelle peut retentir sur la morphologie comme sur les propriétés physiologiques en provoquant une sélection ne laissant subsister que certains germes doués de propriétés spéciales?

De simples modifications du milieu de culture peuvent donner lieu, pour certains microbes, à l'apparition de races particulières se distinguant sérologiquement de l'espèce primitive. Rappelons à ce propos le comportement du bacille coquelucheux qui, selon qu'il se développe sur gélose ordinaire ou sur gélose additionnée de sang, se différencie suffisamment pour que l'injection de ces deux cultures permette l'obtention de sérums qui ne sont pas identiques, chacun d'eux correspondant fidèlement à la culture inoculée [1].

Dans le présent travail, nous envisagerons exclusivement



l'influence qu'un élément minéral, le calcium, est capable d'exercer sur le comportement des cultures.

J. Bordet et E. Renaux [2] ont montré récemment que la présence de sels calciques dans la gélose de culture favorise singulièrement, pour ce qui concerne le microbe du charbon, l'apparition du type asporogène aux dépens de la souche sporogène primitive. En présence de ce résultat, on devait se demander si l'existence de calcium dans les milieux de culture ne représente pas un facteur dont il est essentiel de tenir compte lorsqu'on étudie les caractères des espèces microbiennes et notamment lorsqu'on cherche à préciser leurs liens de parenté. Telle est la question que nous nous sommes posée en nous adressant le plus souvent, pour la résoudre, à des germes banaux de l'air.

Trois propriétés microbiennes se sont révélées, au cours de nos recherches, comme dépendant dans une mesure appréciable de la présence ou de l'absence de sels calciques : ce sont la morphologie, la sporogénèse et la production de pigment.

Les milieux nutritifs, calciques et oxalatés, utilisés dans nos expériences, sont préparés comme suit : 2 portions égales de bouillon sont additionnées d'un dixième de leur volume, l'une d'une solution d'oxalate de soude à 2 p. 100, l'autre d'eau distillée. Ce bouillon est ensuite gélosé à raison de 2 grammes p. 100 et réparti, après fusion, en tubes. Le bouillon gélosé non oxalaté reçoit ensuite, par tube et après nouvelle fusion, IV gouttes d'une solution à 1 p. 100 de chlorure de calcium. On dispose ainsi de tubes de gélose dont une part (gél. ox) est oxalâtée à 2 p. 1.000, l'autre (gél. ca) étant additionnée d'un léger excès de calcium.

## I. — CALCIUM ET SPORULATION.

La sporulation est une des propriétés microbiennes le plus régulièrement sensibles aux variations de la teneur en sels de Ca du milieu nutritif; la privation de ces sels permet en effet une sporulation remarquablement active et semble même pouvoir faire produire des spores par des espèces qui normalement n'en forment pas.

Nous considérerons tout d'abord un microbe de l'air, entre-

tenu au laboratoire en raison de sa grande sensibilité au lysozyme et dont les cultures sur gélose ne s'étaient jamais montrées sporulées à l'examen microscopique. L'isolement pratiqué à partir d'une de ces cultures pures la montre dissociée en 2 types caractérisés par l'aspect de leurs colonies : l'un forme des colonies bombées, épaisses et à surface lisse (soit Bo) ; l'autre développe des colonies plates et ternes (soit Pl). De plus, ces deux types diffèrent par la morphologie : le premier est un bâtonnet plus court et plus trapu que le second, long bacille rectangulaire. La coloration par le Ziehl à chaud suivie, après refroidissement, de lavage à l'alcool et de recoloration au bleu de méthylène ne montre de spores ni en Bo, ni en Pl.

Transportons Bo sur gél. ox. (soit ox Bo) et sur gél. ca. (soit ca Bo) et mettons les deux cultures à l'étuve ; pratiqué vingt-quatre heures après l'ensemencement, l'examen microscopique met déjà en évidence en ox Bo quelques spores qui s'y montrent très nombreuses après quarante-huit heures, tandis qu'il n'en fait pas voir, même après plusieurs jours, en ca Bo (voir fig. 1 et 2). Autre différence entre les cultures calcique et oxalatée de ce microbe : Ox Bo est un bâtonnet très sensiblement plus court que ca Bo ; de telles différences morphologiques ne sont, nous le verrons plus loin, nullement exceptionnelles. Ox Bo, d'autre part, se lyse plus précocement que ca Bo ; ses cultures de deux jours contiennent déjà de nombreuses formes lysées : ceci permet peut-être de considérer la sporulation comme une réaction de défense de la part du microbe souffrant de la privation de calcium. Signalons enfin qu'en bouillon oxalaté, Bo pousse en tire-bouchon d'aspect gluant, tandis qu'il donne naissance, en bouillon ordinaire, à un trouble homogène. La recherche des spores, par l'examen microscopique, pratiquée sur des cultures âgées de dix jours, montre en ox Bo une pullulation de spores voisinant avec des formes dégénérées nombreuses, tandis qu'elle reste négative pour ca Bo. Celle-ci n'est cependant pas complètement dépourvue de spores ; en effet, une suspension épaisse obtenue par dilution d'une culture sur gélose de ca Bo dans quelques centimètres cubes de bouillon et maintenue pendant une demi-heure dans un bain-marie porté à la température de 75°, introduite à raison de quelques gouttes dans un tube de

gélose, développe sur ce milieu 1 à 2 colonies : ca Bo renferme donc quelques spores, à vrai dire extrêmement rares.

La variété Pl prend, comme Bo, la forme d'un bâtonnet plus court sur gél. ox (ox Pl) que sur gél. ca (ca Pl), mais la recherche des spores par l'examen microscopique, fût-elle pratiquée sur des cultures âgées de dix jours, est négative tant pour ox Pl que pour ca Pl (voir fig. 3 et 4). Appliquons à ces deux cultures le mode d'investigation qui nous a permis de mettre en évidence l'existence en ca Bo de spores, trop peu nombreuses pour être décelables par l'examen microscopique : cette recherche est positive pour ox Pl, tandis que la suspension ca Pl est complètement stérilisée par le chauffage à 75°. Achevons la description de ce microbe en signalant que ses cultures sur gélose ordinaire, tant pour la variété Bo que Pl, offrent les caractères des cultures sur gél. ca. Pour l'une et l'autre des variétés Bo et Pl, le calcium apparaît donc comme un modérateur de la sporogenèse, qu'il semble même pouvoir abolir entièrement (ca Pl).

D'autres microbes de l'air nous ont montré des différences du même ordre, telles les espèces F et G : il suffit de comparer l'aspect microscopique des cultures de ces microbes sur gél. ox et gél. ca pour se convaincre de l'influence considérable que peut avoir l'oxalatation du milieu nutritif sur le pouvoir de sporulation (voir fig. 5, 6, 7 et 8) : telles encore plusieurs autres bactéries qu'il est superflu de décrire ici.

Bornons-nous, pour terminer ce chapitre, à décrire un microbe de l'air (J) dont le comportement est assez particulier. C'est un petit bacille dont les cultures sur milieu oxalaté sont déjà blanches et opaques après quarante-huit heures et presque exclusivement constituées de spores de très petite taille, tandis que celles sur milieu calcique, moins blanches et moins opaques, ne sont que modérément sporulées.

Isolée sur 4 tubes de gélose, la souche calcique se dissocie en deux groupes de colonies en nombre à peu près égal, dont les unes sont arrondies, saillantes, opaques, à surface lisse et blanche (soit Ja), tandis que les autres (soit Jb), également arrondies et à surface lisse, sont plates et transparentes. L'isolement démontre de même la dissociation de la souche oxalatée en deux types de colonies, identiques aux précédentes,



mais ici la variété Ja prédomine nettement sur le type Jb.

Repiquons ces deux variétés sur gél. ca et ox (soit ca Ja, ca Jb, ox Ja et ox Jb); ox Ja fournit en quarante-huit heures une couche plus blanche et plus opaque que ca Ja; ox Jb et ca Jb forment une couche transparente. Ox Ja et ca Ja ressemblent, tant par l'aspect des cultures que par l'image microscopique, aux cultures mères ox J et ca J (voir fig. 9 et 10). L'épreuve du chauffage démontre l'existence de spores en ox Jb et ca Jb, trop peu nombreuses pour être décelables à l'examen microscopique qui ne découvre, dans ces cultures, que des formes bacillaires semblables à celles qui voisinent, en Ja, avec de nombreuses spores.

Pratiquons l'épreuve de l'isolement sur chacune des 4 cultures ox et ca Ja, ox et ca Jb : ca Ja et ox Ja reproduisent, à nouveau, et dans les mêmes proportions que J, les 2 types *a* et *b*; ca Jb et ox Jb donnent, à côté d'une très grande majorité de colonies transparentes du type *b*, deux ou trois colonies blanches et opaques du type *a*; repiquées séparément sur gélose, les colonies opaques fournissent des cultures se comportant désormais comme les cultures Ja. Répétés à plusieurs reprises, ces isolements ont toujours abouti aux mêmes résultats; il s'agit donc de deux variétés microbiennes se reproduisant incessamment l'une l'autre, dans des proportions variant avec la teneur en calcium du milieu nutritif.

On ne peut manquer de rapprocher ces constatations de celles faites par J. Bordet et E. Renaux sur la bactériidie charbonneuse : de même que, pour la bactériidie, le calcium favorise la formation du type asporogène à partir du type sporulé, de même il augmente la production du type Jb à partir du type Ja. Mais, tandis que les cultures oxalatées du *Bacillus anthracis* n'ont pas donné lieu à l'apparition du type asporogène, l'oxalate n'entrave pas complètement la production du type *b*; dans les deux cas néanmoins, l'oxalation du milieu nutritif produit des effets analogues, c'est-à-dire entrave la production du type faiblement sporulé (J) ou asporogène (*B. anthracis*).

Ce microbe J peut faire l'objet d'une courte digression théorique, relative à la nature des différences séparant les types *a* et *b*; le fait que ces deux variétés se transforment aisément l'une en l'autre empêche de discerner exactement les caractères

spéciaux à chacune d'elles. Sommes-nous en droit, par exemple, d'attribuer à la variété *b* la faculté de donner naissance à des spores? En effet, les spores, rares en vérité, que l'épreuve du chauffage met en évidence dans les cultures de *Jb* ne se sont-elles pas constituées aux dépens de microbes du type *a*, provenant eux-mêmes des transformations évolutives de la souche *Jb*? Il se pourrait ainsi que la variété *b*, apparemment sporogène, fût en réalité, lorsqu'elle reste pure, incapable de former des spores.

Pour résoudre ce problème, maintenons une demi-heure au bain-marie porté à la température de 70° des émulsions obtenues par dilution, dans du bouillon, des 4 cultures ox *Ja*, ca *Ja*, ox *Jb* et ca *Jb*, et ensemençons, après chauffage, ces émulsions sur gélose ordinaire : la dernière hypothèse sera vérifiée si les cultures nées de ces ensemencements, développées toutes quatre à partir de spores, affectent un aspect identique en formant une couche blanche et opaque. Or, seules les dilutions *Ja* développent une culture en couche blanche fortement sporulée, tandis que les émulsions *Jb* fournissent une couche tout aussi épaisse, mais transparente et très faiblement sporulée.

Les deux variétés *a* et *b*, bien que se reproduisant incessamment l'une l'autre, sont donc nettement distinctes, leurs spores ont des potentialités différentes, et on paraît être en droit de les considérer comme deux races d'un même microbe *J*. Le calcium semble donc intervenir dans le déterminisme d'apparition de véritables races.

## II. — CALCIUM ET PRODUCTION DE PIGMENT.

Les documents relatifs à cette seconde question nous sont fournis par l'étude d'un microbe très activement chromogène : le *Micrococcus prodigiosus*.

Wasserzug [3] a montré, il y a longtemps déjà, qu'une culture pure de ce microbe fournit, par la technique de l'isolement, des colonies de coloration diverse qui, repiquées séparément, donnent des cultures filles inégalement riches en pigment. Cet auteur observa aussi que sur milieux acides la production de pigment par le *prodigiosus* s'exagère tandis qu'apparaissent, dans la culture, des formes bacillaires monstrueuses.

Comment se comporte le *prodigiosus* sur gélose oxalatée ou sur gélose calcique ? Dès le premier repiquage, nous avons constaté que sur milieu oxalaté la culture est d'un rouge franc, tandis qu'elle est rose pâle, parfois presque blanche, sur milieu calcique, et cette différence est toujours aussi frappante quel que soit le degré de pigmentation de la colonie séparée qu'on utilise pour ensemençer les deux milieux. Il convient de noter qu'à cette variation de la chromogénèse ne correspond aucune altération de la morphologie microbienne. Une image très grossière de l'influence de l'oxalatation de la gélose sur la production de pigment par le micrococcus peut être fournie par la comparaison colorimétrique des dilutions, dans un volume donné d'eau distillée, de cultures obtenues sur gélose soit calcique, soit oxalatée : les colorations des deux émulsions ne deviennent comparables que pour une dilution 3 à 10 fois plus grande de la culture oxalatée. Encore remarque-t-on, même dans ces conditions, une différence de tonalité dans la teinte des émulsions, qui se montre plutôt orange pour la culture calcique et plutôt rouge pour la culture oxalatée.

Comment interpréter l'importance de l'influence du calcium sur l'élaboration du pigment par le *Micrococcus prodigiosus* ?

Deux explications simples de ce phénomène se présentent tout d'abord à l'esprit. L'intervention du calcium peut être directe en rendant le matériel alimentaire moins propice à la fabrication du pigment par chaque individu microbien ; elle peut être indirecte en favorisant la formation, par variabilité, d'éléments microbiens faiblement pigmentogènes. Comme on va le voir, aucun argument absolument décisif ne vient corroborer l'une ou l'autre de ces deux hypothèses, la seconde apparaissant toutefois comme la plus vraisemblable.

L'isolement pratiqué sur gélose calcique aux dépens de la souche calcique fournit des colonies diversement colorées, les unes extrêmement pâles, presque blanches, les autres de couleur saumon assez vive. Traitée de même, la souche oxalatée se dissocie en colonies uniformément plus rouges que les précédentes mais qui, comme celles-ci, ne sont pas toutes colorées avec la même intensité.

L'isolement croisé, à savoir de la souche calcique sur gélose oxalatée et vice versa, démontre que l'origine, calcique ou oxa-



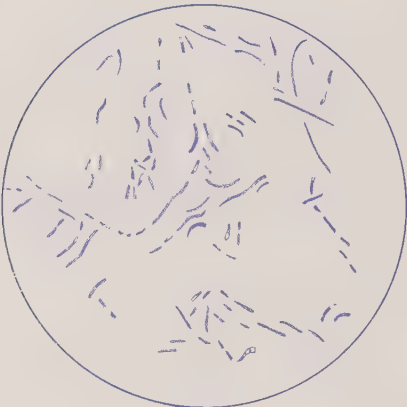




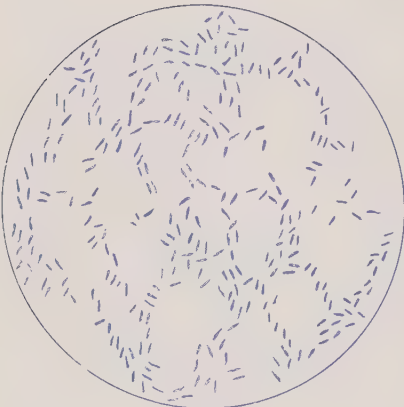
1



2



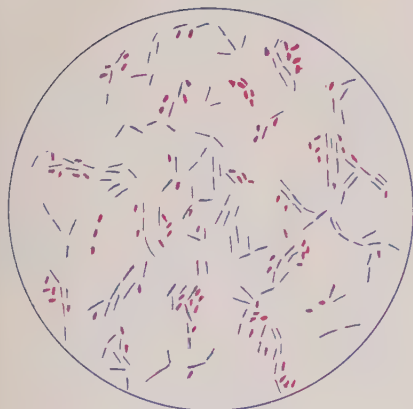
3



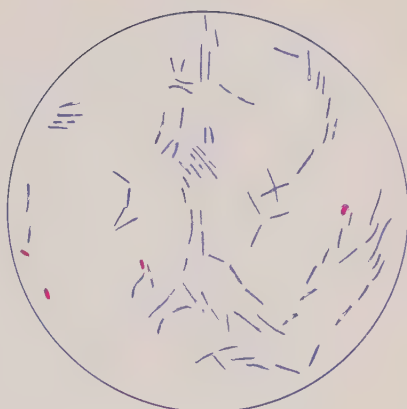
4



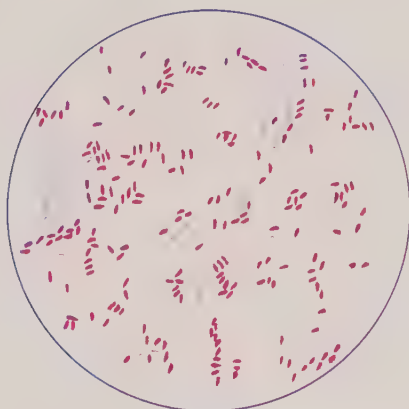
5



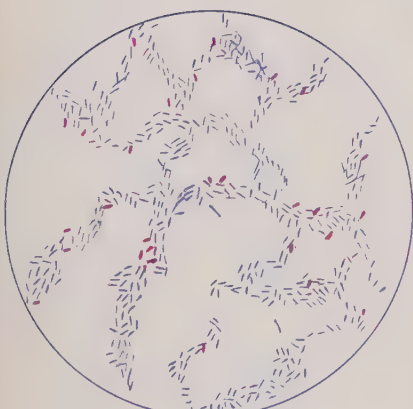
6



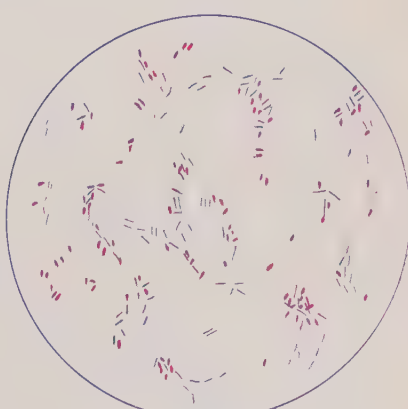
7



8



9



10





latée, de la souche ne retentit pas sur l'aspect des colonies isolées : qu'il soit pratiqué à partir d'une culture sur gélose calcique ou sur gél. ox, un isolement sur gél. ox fournit un mélange de colonies plus ou moins diversement colorées, mais uniformément plus rouges que celles issues d'un isolement sur gélose calcique, celui-ci fût-il réalisé à partir d'une souche oxalatée. De même, le repiquage, sur un milieu donné, d'une colonie isolée fournit une culture en couche continue dont le degré de pigmentation dépend uniquement de la composition minérale de ce milieu : c'est ainsi que, par exemple, les colonies les plus blanches de l'isolement calcique donnent naissance à une culture rouge sur gélose oxalatée, tandis qu'une culture sur gélose calcique, issue d'une des colonies les plus pigmentées de l'isolement pratiqué sur gél. ox offre une teinte rose pâle. Seule la composition actuelle du milieu nutritif importe donc ; les modifications de la teneur en calcium de ce milieu ne troublent pas les potentialités héréditaires du microbe.

Nolons enfin que la coloration des cultures du *prodigiosus* sur gélose ordinaire est intermédiaire entre celle des cultures sur gél. ox et gél. ca, plus proche toutefois de cette dernière. Il va sans dire que l'ensemencement de gélose oxalatée secondairement additionnée d'un excès de chlorure calcique fournit une culture identique à celle qui pousse sur gélose calcique.

Tout se passe en somme comme s'il existait deux variétés de *Micrococcus prodigiosus*, l'une rouge et l'autre blanche, capables de s'engendrer mutuellement. Le type blanc prédomine parmi les descendants d'un individu blanc tandis que la descendance d'un microbe pigmenté est constituée d'une majorité d'éléments rouges. Cette hypothèse s'accrédite du fait qu'on ne peut obtenir, par isollements successifs et sélection des colonies de colorations extrêmes, des cultures définitivement blanches ou rouges ; le repiquage d'une colonie blanche fournit une culture d'une rose plus clair que celle née de l'ensemencement d'une colonie foncée, mais ces différences s'atténuent pour disparaître après quelques passages successifs.

L'oxalation du milieu nutritif aurait, dans ces conditions, pour effet de favoriser la genèse du type rouge sans toutefois empêcher complètement la formation d'individus dépourvus de pigment. Cette action serait, on ne peut manquer de s'en aper-

cevoir, assez comparable à celle que nous a révélée l'étude des modifications apportées à l'évolution du microbe J par la décalcification du milieu gélosé : l'oxalation déterminerait une prépondérance relative de la variété *prodigiosus* rouge de même qu'elle permet la formation en proportion plus grande d'éléments du type Ja. L'exemple du *prodigiosus* confirmerait ainsi l'importance du calcium comme facteur de la variabilité microbienne.

Dans un ordre d'idées analogue, c'est-à-dire concernant les produits du métabolisme microbien, nous avons recherché si l'oxalation du milieu n'exerce pas d'influence sur la toxogénèse. Nous nous sommes adressé au bacille diphtérique et n'avons pas trouvé de différence appréciable dans la teneur en toxine des cultures contenant du calcium soluble ou additionnées d'oxalate.

### III. — CALCIUM ET MORPHOLOGIE.

La bactériologie, comme ses sœurs aînées, la zoologie et la botanique, dut faire appel, dans ses débuts, pour pouvoir ébaucher une classification des organismes qu'elle étudie, à leur propriété la plus apparente, la plus aisée à définir, à savoir leur forme extérieure.

Dès les tout premiers temps de l'ère bactérienne, en 1872, Cohn énonçait d'une façon sans doute trop absolue la loi de la constance morphologique des êtres microscopiques et de la répartition des microbes en espèces tranchées et invariables, que leur forme permet de distinguer nettement. Il plaçait ainsi la science nouvelle sous l'empire de lois qui, comme l'ont attesté des siècles d'observation, régissent la biologie des êtres supérieurs, animaux et végétaux. Se basant uniquement sur la morphologie, Cohn classa sommairement les bactéries en bacilles, microcoques, vibrions et spirilles.

L'imprécision des techniques bactériologiques usitées à cette époque devait faire surgir, contre cette théorie justifiée dans ses grandes lignes, des objections émanant d'expérimentateurs qui, tel Naegeli, opérant sur des cultures impures, crurent pouvoir identifier bacilles, cocci, vibrions et spirilles et conclure à l'unicité de l'espèce bactérienne, celle-ci revêtant, selon le milieu de culture, l'une ou l'autre de ces formes diverses.

L'application généralisée des techniques rigoureuses préconisées par l'école pastoriennne eut comme conséquence rapide d'infirmier la thèse de Naegeli et de faire proclamer la loi, prématurément formulée par Cohn, de l'existence d'espèces bactériennes aussi strictement définies que le sont les espèces zoologiques ou botaniques. On vit alors se multiplier, principalement dans le domaine de la bactériologie pathogène, les critères susceptibles de faciliter et de préciser l'identification des espèces microbiennes, tels les caractères des cultures sur milieux variés, l'aspect des colonies isolées, les propriétés biochimiques, et, pour les espèces pathogènes, la virulence et la sensibilité aux sérums spécifiques.

La morphologie n'est désormais plus la seule propriété caractéristique de l'espèce microbienne ; on continue cependant à admettre sa constance relative. Gaffky écrit : « Il n'est personne qui puisse dire avoir vu un spirille ou un spirochète provenir d'un bacille ni un bacille d'un microcoque. »

C'est tout au plus si, « admettant en principe la constance de la forme, les auteurs reconnaissent cependant qu'une espèce peut parfois, dans des conditions données, acquérir temporairement des formes anormales » [3]. Parmi ces conditions spéciales, signalons la présence d'antiseptique dans les milieux de culture, l'acidification de ceux-ci, le chauffage à une température de 50° à 60°, tous artifices réalisés principalement par Wasserzug. Rappelons que cet auteur parvint, par l'acidification du milieu nutritif, à faire produire des formes bacillaires par le *Micrococcus prodigiosus*. Ces formes anormales doivent être considérées comme des formes d'involution, car, dans les milieux acides, le microbe ne se développe qu'avec lenteur et, après avoir donné naissance à des bacilles peu nombreux, reprend après quelques jours sa forme originelle ; une transformation morphologique stable ne s'obtient qu'à la faveur de nombreux passages sur milieux acides (à la quinzième génération). De pareilles conditions réalisent donc une véritable intoxication du microbe qui, sous cette influence pernicieuse, produit des formes monstrueuses dégénérées.

D'un tout autre ordre sont les importantes modifications qu'imprime, comme nous avons pu l'observer, à la morphologie de certaines bactéries l'oxalation du milieu nutritif.



Ces modifications apparaissent dès la première génération et sans que le microbe accuse le moindre signe de souffrance; elles sont du reste réversibles, le microbe conservant intactes ses potentialités héréditaires. De cette façon une culture prend, en vingt-quatre heures et quelle que soit sa provenance, l'aspect microscopique caractéristique du milieu sur lequel elle se développe : ceci rappelle en tous points ce que nous a enseigné l'étude des modifications apportées par l'oxalatation aux propriétés de sporulation et de chromogénèse.

A vrai dire, nombreux sont les microbes dont la forme demeure indifférente à cette modification de composition du milieu nutritif, tels par exemple divers microbes pathogènes, bacille diphtérique, bacille typhique, vibrion de Metchnikoff que nous avons étudiés.

Nous nous bornerons à décrire certains microbes provenant de l'air, dont les cultures calcique et oxalatée accusent des différences morphologiques extrêmement nettes, et nous ferons d'abord remarquer que, pour ces quelques exemples étudiés, la privation de calcium détermine toujours une diminution de la longueur du microbe. Le plus souvent l'aspect macroscopique des cultures est identique sur milieux ca et ox, parfois cependant le microbe cultive en couche plus épaisse en présence d'oxalate.

Le microbe A cultive sur gélose oxalatée ou calcique en une couche granuleuse d'un brun rosé qui se dissocie, par la technique de l'isolement, en colonies d'aspect identique sur milieux ca et ox. Mais l'examen microscopique révèle entre les cultures calcique et oxalatée de ce microbe une différence morphologique considérable (voir fig. 11 et 12). Sur gél. ca, A se montre assez pleiomorphe, affectant la forme d'un bâtonnet massué à extrémité très renflée; en présence d'oxalate, il pousse en chaînettes plus ou moins longues, constituées de petits éléments arrondis qui ne rappellent plus en rien les bâtonnets des cultures sur milieu calcique. Les différences d'aspect sont tellement considérables qu'un observateur non prévenu, examinant les préparations, n'hésiterait pas à affirmer qu'il se trouve en présence de deux espèces absolument différentes. Et cependant la souche oxalatée, repiquée sur gél. ca, reprend aussitôt la forme d'un bâtonnet massué et, vice versa, la souche calcique,

transportée sur gél. ox, se transforme en éléments cocciformes. Sur gélose ordinaire le microbe adopte, comme sur gél. ca, la forme d'un bâtonnet à extrémité globuleuse.

De telles constatations sont instructives en ce qu'elles démontrent l'inconstance de la morphologie microbienne : le changement profond que détermine, dans la morphologie de A, l'oxalatation du milieu nutritif ne s'accompagne d'aucune diminution de la vitalité du microbe, d'aucune modification de ses potentialités héréditaires; la production de pigment brun rosé demeure inchangée. Il est remarquable qu'un élément purement minéral, le calcium, ait une influence aussi considérable sur la morphologie microbienne.

On pourrait objecter, aux considérations précédentes, que si l'étude de ces modifications morphologiques offre un intérêt théorique, la composition minérale des différents milieux usuels ne varie pas suffisamment, dans les conditions de la pratique, pour pouvoir produire de tels changements et rendre ainsi moins certain le diagnostic morphologique des espèces microbiennes. N'oublions pas cependant que la teneur en calcium des milieux nutritifs usuels est susceptible de variations pouvant dépendre notamment du degré d'alcalinisation du bouillon. Or, des différences relativement peu importantes dans la teneur en sels calciques du milieu, telles celles qui séparent notre gélose calcique de la gélose ordinaire, suffisent à déterminer des variations susceptibles de troubler l'identification, fondée sur la morphologie, de deux cultures d'une même espèce. A vrai dire le microbe A, trop pléiomorphe en milieu calcique, ne donne guère lieu à cette observation; décrivons le microbe B qui la justifie davantage.

B (voir fig. 13 et 15) présente sur gélose calcique la forme d'un long bacille flexueux tandis qu'il affecte l'aspect d'un petit coccobacille sur milieu oxalaté. Ensemençons ce microbe sur gélose ordinaire, à partir des souches calcique et oxalatée. B prend sur gélose ordinaire (voir fig. 14) la forme d'un bâtonnet dont les dimensions sont intermédiaires entre celles des formes ca et ox et qu'on ne songerait pas à identifier avec aucune de ces dernières. Une simple différence quantitative de la teneur en calcium de la gélose suffit donc à créer, entre les cultures de B, une différence morphologique importante.

On peut retrouver, dans les cultures sur gél. ox issues de l'ensemencement d'une souche calcique, à côté de nombreux coccobacilles jeunes et bien colorés, quelques longs bacilles très rares, lysés et peu colorables, apportés par l'ensemencement et qui ne se sont pas reproduits.

Les cultures sur gél. ca et ox sont constituées toutes deux d'une couche mince, visqueuse, de couleur jaunâtre, ayant la même apparence. Il est remarquable qu'aucune différence d'aspect macroscopique ne corresponde au contraste morphologique si tranché que le microscope révèle.

Décrivons encore brièvement quelques autres bactéries de l'air, dont la morphologie est profondément modifiée par l'oxalatation de la gélose. Toutes, comme les précédentes, présentent ce caractère essentiel de ne pas conserver trace, après retour sur milieu ordinaire, de la modification morphologique déterminée par la privation de calcium.

C (voir fig. 16 et 17) est un bacille mince, légèrement incurvé, en forme d'aiguille à extrémités effilées sur milieu calcique. Cultivé sur gélose oxalatée, il se transforme en un petit coccobacille ovoïde. Pour ce microbe, comme pour les précédents, la modification déterminée par l'oxalatation a donc consisté en un raccourcissement considérable. C cultive sur gél. ca et ox, en une couche de couleur jaune orangée. Encore une fois, la forme de l'individu né sur milieu oxalaté ne rappelle plus en rien celle du microbe cultivé en présence de sels calciques; néanmoins les deux cultures sont également prospères.

D (voir fig. 18 et 19) se présente sur milieu calcique comme un bacille plus court et plus trapu que C; l'oxalatation de la gélose le transforme en un coccobacille. Ses cultures sont visqueuses, de couleur jaune pâle.

Plusieurs autres microbes encore, qu'il est superflu de décrire, se sont montrés très sensibles à l'oxalatation du milieu nutritif; loin d'être l'exception, ils constituaient une majorité dans la petite collection de microbes de l'air que nous avons étudiés. Tel est le cas déjà signalé des microbes Bo et Pl, bâtonnets plus longs et plus larges sur milieu calcique où ils tendent à prendre une forme filamenteuse.

La morphologie si peu caractérisée des coccobacilles et des cocci se prête mal à des différenciations de cet ordre; cepen-

dant un des cocci étudiés formait des grains sensiblement plus volumineux sur milieu calcique que sur milieu oxalaté.

Il va sans dire que la signification des modifications morphologiques que nous observons nous échappe entièrement; aucun procédé expérimental ne peut nous renseigner à cet égard; nous avons cependant insisté sur le fait que ces modifications ne s'accompagnent d'aucun signe apparent de souffrance du microbe et n'altèrent aucunement les potentialités héréditaires de celui-ci. Il resterait à rechercher si un séjour prolongé du microbe sur gélose calcique ou oxalatée n'aurait pas pour effet de fixer ces diverses modifications en les rendant transmissibles à la descendance; l'entretien de nos cultures pendant quelques mois n'y est pas parvenu.

Nous sommes donc autorisés, dans l'état actuel de nos connaissances, à considérer la forme extérieure du microbe comme une propriété relativement labile, sujette à des variations profondes au même titre que d'autres propriétés microbiennes telle, par exemple, la formation du pigment. Nos recherches viennent ainsi confirmer, en étendant sa portée et en la rendant plus frappante, la notion que, chez les êtres microscopiques, la morphologie n'est pas un attribut immuable constituant à lui seul le signalement de l'espèce.

La notion que diverses espèces microbiennes peuvent affecter la même morphologie et qu'inversement la forme des individus d'une même espèce peut varier avec le milieu montre le peu de foi qu'il faut avoir, du moins dans de nombreux cas, dans le diagnostic purement morphologique des espèces bactériennes.

#### RÉSUMÉ.

La privation de calcium modifie assez profondément certaines propriétés microbiennes; elle exagère, par exemple, assez régulièrement et dans de fortes proportions la sporulation des bactéries. Une espèce microbienne constituée de deux races inégalement riches en spores voit, sous l'influence de l'oxalation du milieu nutritif, se marquer une prédominance de la variété fortement sporogène. Le calcium apparaît donc comme un des facteurs de la variabilité microbienne.

C'est vraisemblablement une perturbation de cette variabilité



qui explique l'exagération importante du pouvoir chromogène du *Micrococcus prodigiosus* observée sous l'influence de la privation de calcium.

Celle-ci détermine enfin, chez certains bacilles, des modifications morphologiques considérables en les transformant en éléments courts, le plus souvent en forme de coccobacilles.

Ces modifications déterminées par l'oxalatation du milieu nutritif ont comme caractère essentiel de ne pas comporter de diminution de la vitalité du microbe ni d'altération de ses potentialités héréditaires; remis au contact du calcium, le microbe reprend aussitôt ses caractères normaux.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] BORDET et SLEESWYCK, Sérodiagnostic et variabilité des microbes suivant le milieu de culture. Ces *Annales*, 1910, p. 476.
- [2] J. BORDET et E. RENAUX. L'influence du calcium sur l'évolution des cultures de charbon. Ces *Annales*, 1930.
- [3] WASSERZUG, Variation de forme chez les bactéries. Ces *Annales*, 2, 1888, p. 75.

#### EXPLICATION DES FIGURES

FIG. 1, 2, 3 et 4. — Cultures âgées de quarante-huit heures des variétés Bo et Pl sur gélose calcique et oxalatée. L'examen découvre d'assez nombreuses spores en ox Bo (fig. 2), tandis qu'il n'en fait pas voir dans les autres cultures. Cependant l'épreuve du chauffage, qui stérilise la culture ca Pl, démontre l'existence de spores, à vrai dire très rares, en ca Bo et ox Pl. Les cultures ox Bo (fig. 2) et ox Pl (fig. 4) sont formées d'éléments sensiblement plus courts que les cultures ca Bo (fig. 1) et ca Pl (fig. 3).

FIG. 5 et 6. — Cultures, âgées de sept jours, du microbe de l'air F sur gélose calcique et oxalatée. A noter l'existence de spores beaucoup plus nombreuses en ox F (fig. 6) qu'en ca F (fig. 5).

FIG. 7 et 8. — Microbe de l'air G. Les spores, peu abondantes sur gélose calcique (fig. 7), sont très nombreuses sur gélose oxalatée (fig. 8).

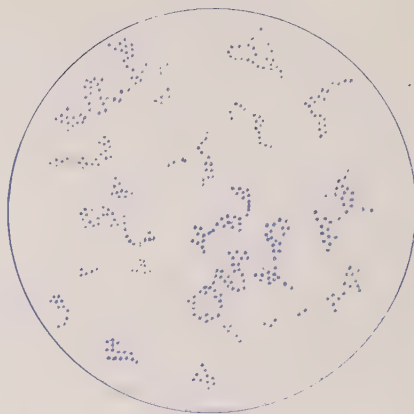
FIG. 9 et 10. — Les spores sont beaucoup plus nombreuses dans la culture oxalatée (fig. 10) de la variété Ja du microbe J que dans sa culture sur gélose calcique (fig. 9).

FIG. 11 et 12. — Cultures, âgées de vingt-quatre heures, du microbe de l'air A sur gélose calcique (fig. 11) et oxalatée (fig. 12). Sur gélose calcique,

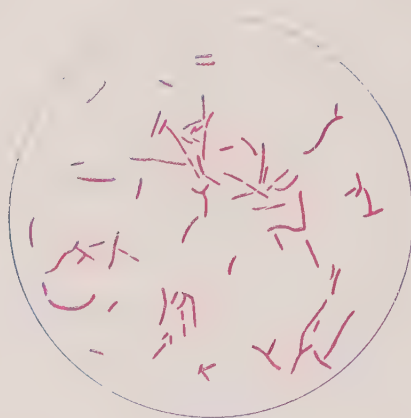




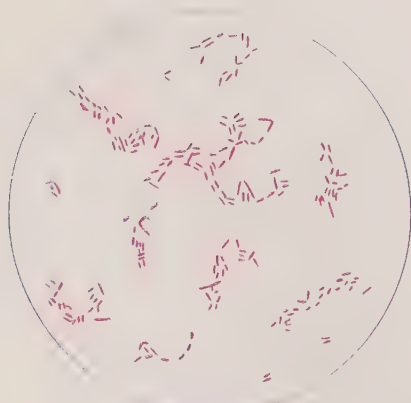
11



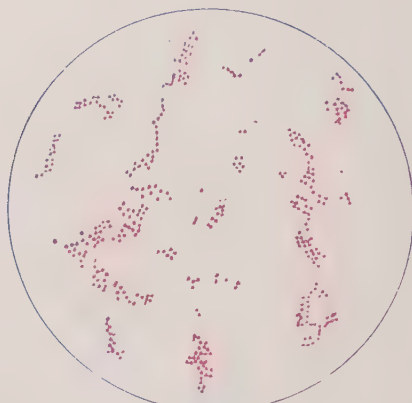
12



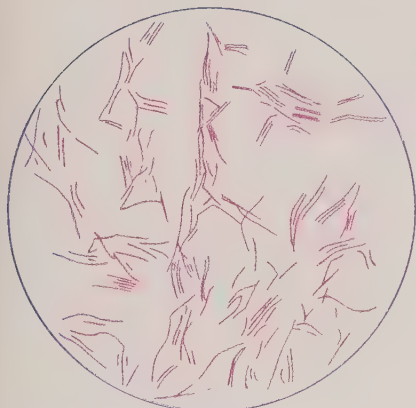
13



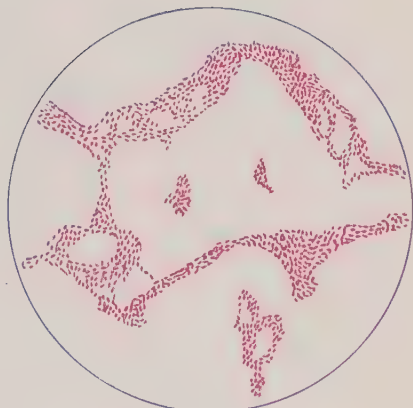
14



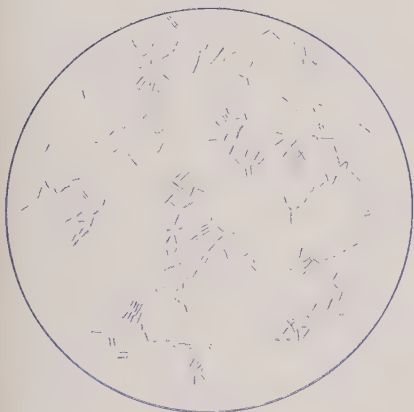
15



16



17



18



19





A est un bâtonnet pléiomorphe à extrémité très renflée; en présence d'oxalate, il se transforme en éléments courts et arrondis généralement groupés en chainettes. Un observateur non averti, examinant ces préparations, croirait être en présence de 2 espèces microbiennes différentes. La même remarque s'impose pour les cultures des microbes B, C et D.

FIG. 13, 14 et 15. — Préparations de cultures du microbe B sur gélose calcique (fig. 13), ordinaire (fig. 14) et oxalatée (fig. 15). B est un long bacille sur gélose calcique, un coccobacille en présence d'oxalate et un bacille court, de dimensions intermédiaires entre celles des deux formes précédentes, sur gélose ordinaire.

FIG. 16 et 17. — Cultures du microbe C sur gélose calcique (fig. 16) et oxalatée (fig. 17). La différence morphologique est ici particulièrement curieuse : bacille effilé en forme d'aiguille en présence de calcium, C se transforme en un coccobacille ovoïde sur milieu oxalaté.

FIG. 18 et 19. — Microbe D. Bacille en présence de calcium (fig. 18), D développe des petits éléments cocciformes sur gélose oxalatée (fig. 19).

## COMPORTEMENT DU VIRUS RABIQUE DANS L'ENCÉPHALE DU COQ ET DU PIGEON

par P. REMLINGER et J. BAILLY.

Au cours de nos recherches sur la rage du coq (1) nous avons eu l'occasion de recueillir l'observation suivante d'une interprétation difficile et qui a été le point de départ du présent travail :

Le 5 mars 1928, un coq qui avait été inoculé dans le cerveau avec du virus de rue présente tous les symptômes de la rage furieuse. On le met en présence d'un congénère. Il se précipite aussitôt sur lui et lui inflige une dizaine de coups de bec qui se traduisent par autant de blessures sanglantes de la tête et des barbillons. Aucune particularité à noter jusqu'au 22 novembre, c'est-à-dire jusqu'au deux cent trente-sixième jour après l'agression. Ce jour-là, comme on désespère de voir l'animal prendre la rage à la suite des coups de bec reçus, on l'inocule dans le cerveau avec un virus de rue tuant le lapin en douze jours. Dès le lendemain, on observe une sorte de torticolis très particulier qui détermine une position tout à fait insolite de la tête. L'encolure a subi une torsion de  $180^\circ$  autour de son axe de symétrie, de telle manière que la région mandibulaire est devenue supérieure et la région crânienne inférieure. Ce torticolis est absolument irréductible. L'animal présente en même temps de profonds troubles de l'équilibre. Il se tient habituellement immobile, mais, si on l'excite, il se déplace en cercle (mouvements de manège). Parfois, comme entraîné par le poids de sa tête, il semble courir après son centre de gravité et finit par culbuter dans le sens antéro-postérieur. La préhension des aliments et des boissons est impossible. Le coq ne peut ni saisir les graines sur le sol, ni ingurgiter la moindre

(1) P. REMLINGER et J. BAILLY, La rage du coq. Ces *Annales*, 42, février 1929, p. 153-167 et Nouvelles observations relatives à la rage du coq. Communication à l'Académie Vétérinaire de France. Séance du 30 octobre 1929, p. 551-559.

goutte d'eau. Les jours suivants, son état est stationnaire. Même torticolis irréductible. Même position anormale de la tête. Mêmes troubles de l'équilibre. Mêmes culbutes. Amaigrissement rapide et cachexie progressive, sans paralysie véritable. Mort le 2 décembre, deux cent quarante-six jours après la première inoculation, dix jours après la deuxième. Aucune lésion macroscopique à l'autopsie. Une émulsion du cerveau est inoculée sous la dure-mère d'un lapin et d'un cobaye. Le lapin présente le 11 décembre (au neuvième jour) tous les signes de la rage furieuse à laquelle il succombe le lendemain. Le cobaye est trouvé mort le 10 décembre au matin (huitième jour), alors que la veille il n'avait attiré l'attention par aucun symptôme. Un lapin inoculé avec une émulsion du cerveau présente le 19 décembre (au neuvième jour) des symptômes de rage furieuse. Mort le 21 décembre (onzième jour).

Voici donc un coq qui, grièvement mordu à la crête par un congénère enragé, ne présente pendant deux cent trente-six jours aucune manifestation rabique. On croit pouvoir l'utiliser pour une nouvelle expérience et on lui injecte du virus de rue dans le cerveau. Dès le lendemain de la trépanation, l'animal présente des troubles de l'équilibre et surtout une rotation de la tête et du cou rendant l'alimentation impossible. Il meurt dix jours plus tard et les passages effectués avec le cerveau sont positifs. L'existence du virus rabique dans l'encéphale ne faisant ainsi aucun doute, quelle signification convenait-il de lui attribuer? Le coq a-t-il succombé à une rage fruste (torticolis, troubles de l'équilibre) consécutive à la morsure de son congénère, la trépanation ayant fait passer brusquement à l'activité un virus demeuré latent dans le cerveau depuis plusieurs mois? (On sait que des faits analogues émaillent l'histoire de la rage humaine et de la rage canine.) Ou plutôt les accidents présentés n'étaient-ils pas de nature traumatique (compression ou irritation provoquées par l'injection intracérébrale d'une grande quantité d'émulsion) et le virus décelé par les passages n'était-il pas simplement le virus inoculé dix jours avant le décès et qui n'aurait pas été détruit *in situ*? Nous avons montré (1)

(1) P. REMLINGER et J. BAILLY, L'évolution du parasite de la rage comporte-t-elle un cycle? Ces *Annales*, novembre 1929, p. 1396, 1407.



qu'injecté dans l'encéphale des animaux réceptifs à la rage, tels que le chien et le lapin, le virus rabique persistait vingt-quatre heures environ au point d'inoculation puis disparaissait pour réapparaître quelques jours avant la manifestation des premiers symptômes rabiques. C'est le *phénomène de l'éclipse*. Injecté dans l'encéphale des animaux réfractaires, dans celui de la tortue en particulier, le virus rabique peut au contraire persister *in situ* un temps très long : deux cent cinquante jours et sans doute davantage. C'est le *phénomène de la permanence*. Antérieurement MM. Kraus et Clairmont (1) avaient constaté chez des animaux faiblement réceptifs : le pigeon et le coq même une persistance analogue, avec cette différence qu'elle n'était pas constante, qu'elle était de durée moindre (douze, treize, vingt-six jours chez le pigeon ; neuf, treize, vingt-quatre jours chez le coq) et que le virus se retrouvait non seulement au point inoculé mais encore dans le bulbe et jusque dans la moelle lombaire, en sorte qu'il paraissait s'agir non d'une permanence ou d'une stagnation mais d'une culture de proche en proche ou d'une propagation. Il nous a paru intéressant de consacrer à ce sujet une nouvelle série d'expériences.

#### 1° EXPÉRIENCES SUR LES COQS.

Une première série d'expériences a porté sur 35 poules ou coqs inoculés dans le cerveau avec du virus de rue d'activité moyenne (virus de rue Tangérois) ou, au contraire, renforcée (virus balkanique aimablement envoyé par M. le Dr Téodorascu, directeur de l'Institut antirabique de Chisinaù). Le lendemain ou le surlendemain de l'inoculation, on commençait à sacrifier les animaux. Il était fait chaque fois deux prélèvements de substance nerveuse, l'un au niveau même du point inoculé, l'autre au niveau du bulbe ou de la moelle lombaire et les émulsions étaient injectées sous la dure-mère du lapin. Voici le détail de ces expériences.

EXPÉRIENCE I. — *Inoculation à des coqs d'un virus de rue d'activité moyenne. Sacrifice des animaux du deuxième au quarantième jour. Passages avec le point inoculé et avec le bulbe.*

(1) KRAUS, GERLACH et SCHWEINBURG, *Lyssa bei Mensch und Tier*, Berlin 1926, p. 259-261.

# VIRUS RABIQUE DANS L'ENCÉPHALE DU COQ ET DU PIGEON 43

Le 25 novembre, 9 coqs reçoivent dans le cerveau 1/10 de cent. cube d'émulsion à 1 p. 50 d'un virus de rue moyennement virulent (virus de rue Tangérois tuant, par inoculation intra-cérébrale, le lapin en dix jours). A partir du surlendemain et à des intervalles variables, ces coqs sont sacrifiés et, chaque fois, des passages sont faits avec une émulsion de la substance nerveuse prélevée soit au point inoculé, soit au niveau du bulbe. Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau suivant :

NUMÉRO du coq	SACRIFIÉ au	RÉSULTAT du passage du point inoculé	RÉSULTAT du passage du bulbe
—	—	—	—
1 . . . . .	2 <sup>e</sup> jour.	∞	∞
2 . . . . .	4 <sup>e</sup> jour.	∞	∞
3 . . . . .	7 <sup>e</sup> jour.	+ rage 13 <sup>e</sup> jour.	∞
4 . . . . .	9 <sup>e</sup> jour.	+ rage 12 <sup>e</sup> jour.	∞
5 . . . . .	11 <sup>e</sup> jour.	+ rage 11 <sup>e</sup> jour.	+ rage 12 <sup>e</sup> jour.
6 . . . . .	14 <sup>e</sup> jour.	∞	+ rage 12 <sup>e</sup> jour.
7 . . . . .	20 <sup>e</sup> jour.	∞	+ rage 14 <sup>e</sup> jour.
8 . . . . .	40 <sup>e</sup> jour.	∞	∞
9 (témoin) . .	Présente, 19 jours après l'inoculation, les premiers symptômes de la rage. Mort le 21 <sup>e</sup> jour. Passages négatifs (neuro-infection mortelle auto-stérilisable).		

EXPÉRIENCE. II. — *Inoculation à des coqs d'un virus de rue d'activité moyenne. Sacrifice des animaux entre la dix-huitième heure et le vingt-sixième jour. Passages avec le point inoculé et avec la moelle lombaire.*

Le 30 janvier, 12 coqs reçoivent dans le cerveau 1/10 de cent. cube d'une émulsion à 1 p. 50 d'un virus de rue d'activité moyenne (virus de rue Tangérois tuant par voie sous-dure-mérienne le lapin en dix jours). A partir du lendemain et à des intervalles variables ces coqs sont sacrifiés et des passages sont effectués avec une émulsion de la substance nerveuse prélevée soit au point d'inoculation, soit au niveau de la moelle lombaire. Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau suivant :

NUMÉRO du coq	SACRIFIÉ au	RÉSULTAT du passage du point inoculé	RÉSULTAT du passage de la moelle lombaire
—	—	—	—
1 . . . . .	1 <sup>er</sup> jour (18 h.).	∞	∞
2 . . . . .	2 <sup>e</sup> jour (44 h.).	+ rage 11 <sup>e</sup> jour.	∞
3 . . . . .	3 <sup>e</sup> jour.	∞	∞
4 . . . . .	4 <sup>e</sup> jour.	+ rage 12 <sup>e</sup> jour.	∞
5 . . . . .	6 <sup>e</sup> jour.	∞	∞
6 . . . . .	9 <sup>e</sup> jour.	+ rage 11 <sup>e</sup> jour.	∞
7 . . . . .	13 <sup>e</sup> jour.	+ rage 10 <sup>e</sup> jour.	+ rage 13 <sup>e</sup> jour.
8 . . . . .	18 <sup>e</sup> jour.	+ rage 14 <sup>e</sup> jour.	+ rage 13 <sup>e</sup> jour.
9 . . . . .	22 <sup>e</sup> jour.	+ rage 11 <sup>e</sup> jour.	+ rage 11 <sup>e</sup> jour.
10 . . . . .	26 <sup>e</sup> jour.	+ rage 11 <sup>e</sup> jour.	+ rage 11 <sup>e</sup> jour.
11 (témoin) .	Présentent l'un et l'autre le 26 février, au 27 <sup>e</sup> jour. les premiers symptômes de la rage. Mort chez l'un. Guérison chez l'autre.		
12 (témoin) .			

EXPÉRIENCE III. — *Inoculation dans le cerveau de 4 coqs d'un virus de rue de virulence moyenne. Sacrifice des animaux après cinq, dix, quinze et vingt jours. Passages avec le point inoculé et avec le bulbe.*

Le 8 août, 4 coqs reçoivent dans le cerveau 1/10 de cent. cube d'une émulsion à 1 p. 50 d'un virus de rue de virulence moyenne (virus de rue Tangérois). Ils sont sacrifiés respectivement cinq, dix, quinze et vingt jours après l'inoculation et des passages sont faits avec une émulsion de la substance nerveuse prélevée soit au point d'inoculation, soit au niveau du bulbe. Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau suivant :

NUMÉRO du coq	SACRIFIÉ au	RÉSULTAT du passage du point inoculé	RÉSULTAT du passage du bulbe
—	—	—	—
1 . . . . .	5 <sup>e</sup> jour.	∞	∞
2 . . . . .	10 <sup>e</sup> jour.	+ rage 12 <sup>e</sup> jour.	∞
3 . . . . .	15 <sup>e</sup> jour.	+ rage 12 <sup>e</sup> jour.	+ rage 12 <sup>e</sup> jour.
4 . . . . .	20 <sup>e</sup> jour.	∞	+ rage 15 <sup>e</sup> jour.

EXPÉRIENCE IV. — *Inoculation dans le cerveau de 10 coqs d'un virus rabique renforcé (virus balkanique de Chisinau). Sacrifice des animaux du deuxième au quarantième jour. Passages avec le point d'inoculation et avec le bulbe.*

Le 4 décembre, 10 coqs reçoivent dans le cerveau 1/10 de cent. cube d'émulsion à 1 p. 50 d'un virus de rue renforcé (virus balkanique de Chisinau tuant par inoculation intra-cérébrale le lapin en huit jours). A partir du surlendemain et à des intervalles variables les animaux sont sacrifiés et des passages sont faits avec une émulsion de la substance nerveuse prélevée soit au point d'inoculation, soit au niveau du bulbe. Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau suivant :

NUMÉRO du coq	SACRIFIÉ au	RÉSULTAT du passage du point inoculé	RÉSULTAT du passage du bulbe
—	—	—	—
1 . . . . .	2 <sup>e</sup> jour.	∞	∞
2 . . . . .	5 <sup>e</sup> jour.	∞	∞
3 . . . . .	7 <sup>e</sup> jour.	∞	∞
4 . . . . .	10 <sup>e</sup> jour.	+ rage 11 <sup>e</sup> jour.	∞
5 . . . . .	15 <sup>e</sup> jour.	+ rage 11 <sup>e</sup> jour.	+ rage 11 <sup>e</sup> jour.
6 . . . . .	20 <sup>e</sup> jour.	∞	+ rage 14 <sup>e</sup> jour.
7 . . . . .	25 <sup>e</sup> jour.	+ rage 11 <sup>e</sup> jour.	∞
8 . . . . .	30 <sup>e</sup> jour.	∞	∞
9 . . . . .	40 <sup>e</sup> jour.	∞	∞
10 (témoin) . .	Atteint de rage le 16 <sup>e</sup> jour. Est sacrifié le 21 <sup>e</sup> . Passages négatifs (neuro-infection mortelle auto-stérilisable).		

Que ressort-il de ces expériences? Chez les animaux très réceptifs à la rage : lapins ou chiens, c'est avec une régularité mathématique que se produit, à dater du deuxième jour, l'éclipse du virus. Chez les animaux complètement réfractaires

comme la tortue, c'est avec une régularité analogue qu'on constate pendant deux cent cinquante jours et sans doute bien davantage (1) la permanence du virus au point inoculé. Ainsi qu'il était possible de le prévoir, chez ces animaux faiblement réceptifs que sont les gallinacés, les résultats fournis par les passages ne rentrent dans aucun des deux grands groupes de faits précités. Chez le coq, comme chez les animaux très réceptifs, le virus rabique paraît disparaître du point d'inoculation de façon très précoce. Une seule fois (Expérience 2), nous avons réussi à le mettre en évidence avant la quarante-huitième heure. C'est par contre avec une très grande fréquence que, du septième au quinzième jour, à ce même point d'inoculation, on retrouve le virus. A ce moment, les animaux conservés comme témoins sont encore loin de l'époque où les premiers symptômes rabiques feront chez eux leur apparition; les passages effectués avec le bulbe et surtout avec la moelle lombaire, laquelle n'est pas grevée de la cause d'erreur constituée par un voisinage très étroit avec la région inoculée, sont encore négatifs. Avant tout, la fréquence avec laquelle le virus est décelé par les passages est bien supérieure à celle avec laquelle, abandonnés à eux-mêmes, ces animaux prendraient la rage. Il ne fait ainsi aucun doute que si l'existence des coqs n'était pas délibérément interrompue pour les besoins de l'expérimentation, le virus serait, dans un grand nombre de cas, destiné à demeurer chez eux à l'état latent. C'est cette *latence* qui paraît être la caractéristique essentielle du comportement du virus rabique dans l'encéphale du coq, de même que *l'éclipse* est la caractéristique du comportement du virus chez le lapin et chez le chien et la *permanence* chez la tortue.

Ainsi, chez la tortue réfractaire à la rage, le virus rabique demeure *in situ* un temps fort long vraisemblablement parce qu'il lui est impossible de poursuivre un cycle évolutif. Chez le lapin et chez le chien très réceptifs, le virus échappe de suite à nos investigations, sans doute parce qu'à une des phases du cycle il n'est pas inoculable. Chez le coq, faiblement réceptif,

(1) Nous poursuivons toujours l'étude de ce phénomène. D'où les chiffres de plus en plus élevés de permanence du virus qu'on trouve et sans doute qu'on trouvera dans nos différents mémoires.



le virus poursuit son cycle comme chez le lapin ; il se développe, se propage sans que souvent ceci se traduise par des symptômes morbides. C'est dans un petit nombre de cas seulement que des phénomènes cliniques traduiront le développement du processus. Cette *latence du virus rabique* n'a certainement pas chez le coq une durée très longue et le virus ne tarde pas à succomber aux forces défensives de l'organisme. Même quand des symptômes cliniques se sont manifestés, les réactions de défense ne perdent pas leurs droits. La maladie déclarée est susceptible de guérison mais quelquefois — si on peut dire — celle-ci n'empêche pas la mort (neuro-infection mortelle auto-stérilisable de Levaditi, particulièrement fréquente chez le coq et le pigeon ainsi que nous l'avons montré).

Ces faits empruntent peut-être un intérêt particulier à ce que son assez faible réceptivité à la rage démontrée par les statistiques des premiers temps de la découverte pasteurienne est de nature à rapprocher ici et jusqu'à un certain point l'homme du coq plus que du chien ou du lapin et à ce que des phénomènes de latence du virus rabique ont été à différentes reprises et tout récemment encore (Paltauf, Quast) pris sur le vif en pathologie humaine.

## 2° EXPÉRIENCES SUR LES PIGEONS.

Les expériences sur les coqs ont été répétées chez le pigeon. 47 pigeons ont reçu, dans l'hémisphère cérébral gauche, un virus de rue choisi intentionnellement tantôt faiblement, tantôt moyennement, tantôt très fortement virulent. Le lendemain ou le surlendemain de cette inoculation, on commençait à sacrifier les animaux. L'opération était effectuée à des intervalles qui variaient peu, tous les trois ou quatre jours en moyenne. Il était fait chaque fois deux prélèvements de substance nerveuse, l'un au niveau même du point inoculé, l'autre au niveau du bulbe ou de la moelle lombaire. Les émulsions étaient injectées chaque fois sous la dure-mère du lapin. Voici le détail de ces observations.

EXPÉRIENCE I. — *Inoculation dans le cerveau du pigeon d'un virus de rue peu actif. Sacrifice des animaux entre la vingt-quatrième heure et le cinquième jour. Aucune mise en évidence du virus.*

Le 7 juin, six pigeons reçoivent dans l'hémisphère cérébral gauche 1/10 de cent. cube d'émulsion à 1 p. 50 d'un virus de rue peu actif (virus Tangérois amenant par inoculation intra-cérébrale la mort du lapin en quatorze-quinze jours). Cinq d'entre eux sont sacrifiés respectivement un, deux, trois, quatre, cinq jours après l'inoculation. Chaque fois, des passages sont effectués avec une émulsion de la substance nerveuse prélevée soit au point inoculé, soit au niveau du bulbe. Le sixième pigeon est conservé comme témoin. Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau suivant. Ils ont été du reste complètement négatifs.

NUMÉRO du pigeon	SACRIFIÉ au	RÉSULTAT du passage du point inoculé	RÉSULTAT du passage du bulbe
—	—	—	—
1 . . . . .	1 <sup>er</sup> jour (24 h.).	∞	∞
2 . . . . .	2 <sup>e</sup> jour.	∞	∞
3 . . . . .	3 <sup>e</sup> jour.	∞	∞
4 . . . . .	4 <sup>e</sup> jour.	∞	∞
5 . . . . .	5 <sup>e</sup> jour.	∞	∞
6 (témoin) . . . .	N'a pas pris la rage.		

EXPÉRIENCE II. — *Inoculation dans le cerveau de 8 pigeons d'un virus de rue d'activité moyenne. Sacrifice des animaux entre le cinquième et le dix-septième jour.*

Le 12 décembre, 8 pigeons reçoivent dans l'hémisphère gauche 1/10 de cent. cube d'une émulsion à 1 p. 50 d'un virus de rue tuant par inoculation intra-cérébrale le lapin en dix jours. 3 d'entre eux sont conservés comme témoins. Les 5 autres sont sacrifiés entre le cinquième et le dix-septième jour. Chaque fois, des passages sont faits avec une émulsion de la substance nerveuse prélevée soit au point d'inoculation, soit au niveau du bulbe. Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau suivant :

NUMÉRO du pigeon	SACRIFIÉ au	RÉSULTAT du passage du point inoculé	RÉSULTAT du passage du bulbe
—	—	—	—
1 . . . . .	5 <sup>e</sup> jour.	+ rage 9 <sup>e</sup> jour.	+ rage 11 <sup>e</sup> jour.
2 . . . . .	7 <sup>e</sup> jour.	+ rage 9 <sup>e</sup> jour.	∞
3 . . . . .	8 <sup>e</sup> jour.	+ rage 9 <sup>e</sup> jour.	+ rage 9 <sup>e</sup> jour.
4 . . . . .	12 <sup>e</sup> jour.	∞	∞
5 . . . . .	17 <sup>e</sup> jour.	∞	∞
6 (témoin) . . .	A pris la rage le 18 <sup>e</sup> jour.		
7 (témoin) . . .	A pris la rage le 19 <sup>e</sup> jour.		
8 (témoin) . . .	Sacrifié le 40 <sup>e</sup> jour. Passages du point inoculé et du bulbe négatifs.		

EXPÉRIENCE III. — *Inoculation dans le cerveau de 9 pigeons d'un virus de rue de virulence moyenne. Sacrifice des animaux du deuxième au trente-cinquième jour.*

Le 24 octobre, 9 pigeons reçoivent dans l'hémisphère cérébral gauche 1/10 de cent. cube d'une émulsion à 1 p. 50 d'un virus de rue tuant le lapin en dix jours. A dater du surlendemain, ces pigeons sont sacrifiés à des intervalles variables et des passages sont faits avec une émulsion de la substance nerveuse prélevée soit au point d'inoculation, soit au niveau du bulbe.

Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau suivant :

NUMÉRO du pigeon	SACRIFIÉ au	RÉSULTAT du passage du point inoculé	RÉSULTAT du passage du bulbe
1 . . . . .	2 <sup>e</sup> jour.	∞	∞
2 . . . . .	4 <sup>e</sup> jour.	+ rage 11 <sup>e</sup> jour.	∞
3 . . . . .	7 <sup>e</sup> jour.	∞	∞
4 . . . . .	10 <sup>e</sup> jour.	+ rage 11 <sup>e</sup> jour.	+ rage 11 <sup>e</sup> jour.
5 . . . . .	15 <sup>e</sup> jour.	∞	∞
6 . . . . .	20 <sup>e</sup> jour.	∞	∞
7 . . . . .	25 <sup>e</sup> jour.	∞	∞
8 . . . . .	30 <sup>e</sup> jour.	∞	∞
9 . . . . .	35 <sup>e</sup> jour.	∞	∞

EXPÉRIENCE IV. — *Inoculation dans le cerveau de 12 pigeons d'un virus de rue renforcé (virus balkanique de Chisinaù). Sacrifice des animaux du deuxième au douzième jour. Grande fréquence des résultats positifs. Tous les animaux conservés comme témoins prennent la rage.*

Le 17 août, 12 pigeons reçoivent dans l'hémisphère cérébral gauche 1/10 de cent. cube d'émulsion à 1 p. 50 d'un virus de rue renforcé : virus balkanique de Chisinaù amenant par inoculation intra-cérébrale la mort du lapin en huit jours. Six d'entre eux sont sacrifiés respectivement après deux, quatre, six, huit, dix, douze jours et des passages sont faits par le lapin avec de la substance nerveuse prélevée soit au point d'inoculation, soit au niveau du bulbe. Les 6 autres ont tous contracté la rage du dixième au douzième jour après l'inoculation. Tous ces résultats sont consignés dans le tableau suivant :

NUMÉRO du pigeon	SACRIFIÉ au	RÉSULTAT du passage du point inoculé	RÉSULTAT du passage du bulbe
1 . . . . .	2 <sup>e</sup> jour.	+ rage 13 <sup>e</sup> jour.	∞
2 . . . . .	4 <sup>e</sup> jour.	+ rage 10 <sup>e</sup> jour.	+ rage 11 <sup>e</sup> jour.
3 . . . . .	6 <sup>e</sup> jour.	∞	+ rage 10 <sup>e</sup> jour.
4 . . . . .	8 <sup>e</sup> jour.	∞	∞
5 . . . . .	10 <sup>e</sup> jour.	+ rage 11 <sup>e</sup> jour.	+ rage 11 <sup>e</sup> jour.
6 . . . . .	12 <sup>e</sup> jour.	+ rage 11 <sup>e</sup> jour.	+ rage 14 <sup>e</sup> jour.
7 . . . . .	} Ont tous contracté la rage du 10 <sup>e</sup> au 12 <sup>e</sup> jour après l'inoculation.		
8 . . . . .			
9 . . . . .			
10 . . . . .			
11 . . . . .			
12 . . . . .			

EXPÉRIENCE V. — *Inoculation dans le cerveau de douze pigeons d'un virus de rue renforcé (virus balkanique de Chisinaù). Sacrifice des animaux entre le premier et le quatorzième jour. Grande fréquence des résultats positifs. Tous les animaux conservés comme témoins prennent la rage.*

Le 28 janvier, 12 pigeons reçoivent dans l'hémisphère cérébral gauche 1/10 de cent. cube d'une émulsion à 1 p. 50 d'un virus de rue renforcé (virus balkanique de Chisinaù) amenant par inoculation intracérébrale la mort du lapin

en huit jours. 5 d'entre eux sont conservés comme témoins. Ils devaient contracter la rage, l'un d'eux le 16 février au dix-neuvième jour, les 4 autres le 20 février au vingt-troisième jour. A dater du lendemain de leur inoculation, les 7 pigeons de l'expérience sont sacrifiés à deux, trois ou quatre jours d'intervalle et des passages sont effectués avec une émulsion de substance nerveuse prélevée au point d'inoculation d'une part, au niveau de la moelle lombaire d'autre part. Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau suivant :

NUMÉRO du pigeon	SACRIFIÉ au	RÉSULTAT du passage du point inoculé	RÉSULTAT du passage de la moelle lombaire
1 . . . .	1 <sup>er</sup> jour (48 h.).	∞	∞
2 . . . .	2 <sup>e</sup> jour (48 h.).	+ rage 14 <sup>e</sup> jour.	∞
3 . . . .	3 <sup>e</sup> jour.	∞	∞
4 . . . .	4 <sup>e</sup> jour.	+ rage 14 <sup>e</sup> jour.	∞
5 . . . .	7 <sup>e</sup> jour.	+ rage 11 <sup>e</sup> jour.	∞
6 . . . .	10 <sup>e</sup> jour.	+ rage 11 <sup>e</sup> jour.	+ rage 13 <sup>e</sup> jour.
7 . . . .	14 <sup>e</sup> jour.	+ rage 11 <sup>e</sup> jour.	∞
8 . . . .	} Ont tous contracté la rage; le premier le 19 <sup>e</sup> jour, les quatre autres le 23 <sup>e</sup> jour.		
9 . . . .			
10 . . . .			
11 . . . .			
12 . . . .			

De ces expériences est-il possible de dégager une conclusion? A coup sûr, les résultats obtenus sont beaucoup plus difficiles à interpréter chez les pigeons que chez les gallinacés et ce qui les caractérise avant tout c'est une grande irrégularité. Tout d'abord, les pigeons se sont, plus que les coqs, montrés sensibles au degré d'agressivité du virus inoculé. Un virus faible (Expérience I) a laissé les animaux complètement indifférents sans que cependant le virus ait, comme chez la tortue, traduit cette indifférence par sa permanence dans le système nerveux. Tout s'est passé comme si, déposé dans le cerveau, le virus y avait été immédiatement détruit. Un virus renforcé a donné du dixième au douzième jour (Expérience IV), du dix-neuvième au vingt-quatrième jour (Expérience V) la rage à tous les témoins comme si les animaux inoculés avaient été des chiens ou des lapins. Cependant, le phénomène de la permanence du virus s'observait au point d'inoculation le deuxième et le quatrième jour (Expériences IV et V). Il s'agissait bien d'une permanence locale et non d'une propagation, car les inoculations effectuées en même temps non pas avec le bulbe (inoculations grevées d'erreur du fait de la grande proximité du



point inoculé), mais avec la moelle lombaire, sont demeurées complètement négatives. A ne considérer que les résultats obtenus avec des virus d'activité moyenne, on observe aux cinquième, septième, huitième jours (Expérience II), au quatrième jour (Expérience 3) des passages positifs avec le point inoculé qui peuvent être considérés comme traduisant une permanence du virus. Bien que le phénomène ne soit pas constant puisque les passages effectués le deuxième jour (Expérience III) avec ce même point inoculé ont fourni un résultat négatif, c'est en dernière analyse *cette permanence* qui paraît caractériser chez le pigeon le comportement du virus rabique. Le pigeon se rapproche ainsi davantage des animaux réfractaires à la rage (type : tortue) que des animaux réceptifs (type : chien ou lapin). Il ne paraît pas réagir au virus, comme le coq, de façon originale, par la production de phénomènes de latence.

\*  
\* \*

Il est maintenant bien facile de répondre à la question soulevée par l'observation rapportée au début de ce travail. La maladie qui a entraîné la mort du coq n'était nullement une rage déterminée par les coups de bec d'un congénère enragé, reçus — incubation beaucoup trop longue — deux cent quarante-six jours avant le décès. La mort a été déterminée par la compression et l'irritation provoquées par l'injection intracérébrale d'une grande quantité d'émulsion et surtout par l'inanition, conséquence de l'obstacle que la torsion de l'encolure apportait à l'alimentation. La mort s'est produite dix jours après l'inoculation intracérébrale du virus rabique, précisément au moment où, destiné ou non à demeurer latent, le virus se rencontre avec le plus de fréquence dans l'encéphale des coqs inoculés. Le virus décelé à l'autopsie par les passages n'était autre que celui qui avait été injecté dans le cerveau dix jours auparavant. Si l'animal n'avait pas succombé à l'inanition, ce virus aurait pu ultérieurement lui conférer la rage comme aussi, après être demeuré latent un temps plus ou moins long, il aurait pu s'atténuer puis disparaître sous l'action des forces défensives de l'organisme. Nous ferons remarquer en terminant que si, au lieu d'être décapités ou électrocutés, les condamnés

à mort étaient, ainsi que la proposition en a été faite récemment par le D<sup>r</sup> Espé de Metz, mis à la disposition des laboratoires pour servir à des expériences biologiques, c'est peut-être, étant donné sa réceptivité assez faible comme le coq plutôt que comme le chien ou le lapin que l'homme se comporterait à l'égard du virus rabique. Déposé dans l'épaisseur d'une circonvolution, le virus se développerait, se propagerait même. Le fait est bien certain, mais sans doute cette propagation n'aboutirait-elle pas fatalement à une rage expérimentale mortelle. Nous pensons que, dans un certain nombre de cas, le virus demeuré un temps plus ou moins long latent dans l'encéphale s'atténuerait puis disparaîtrait sous l'action des forces défensives de l'organisme, en sorte que quelques condamnés devraient la vie à l'expérience entreprise. Celle-ci pourrait du reste être réalisée dès maintenant chez les singes anthropoïdes.

*(Institut Pasteur de Tanger.)*

## LA VACCINATION PRÉVENTIVE DE LA TUBERCULOSE PAR LE BCG A KIEW

par M. NECHTADIMENKÖ, O. ODRINA, M. SYSSAK et I. ANGUENITSKI,

*(Institut sanitaire ; Dispensaire antituberculeux de Pétrovski  
et Commission d'étude du BCG à Kiew [1]).*

Dans le but de nous assurer d'abord de l'innocuité du BCG, nous avons entrepris des expériences sur les rongeurs de laboratoire (cobayes et lapins), puis récemment sur des veaux. Nos inoculations étaient faites par les voies sous-cutanée, intrapéritonéale, intraveineuse ou intracardiaque. Les doses employées étaient le plus souvent de 20 milligrammes. Mais nous avons utilisé aussi des doses plus petites et plus fortes, depuis 0 milligr. 4 jusqu'à 100 milligrammes et même 1 gramme.

Les animaux étaient sacrifiés à des périodes variables, de quinze jours à deux mois ou davantage après l'inoculation, pour nous rendre compte des altérations pathologiques produites.

Au voisinage immédiat de l'endroit inoculé, on observe chez les cobayes et les lapins, à la suite des injections de fortes doses, une tuméfaction dont le centre se caséifie et qui ne tarde pas à s'ulcérer. Au bout d'un mois et demi à deux mois l'ulcération se cicatrise puis s'efface complètement. Elle s'accompagne au début d'un engorgement ganglionnaire du voisinage. Quelquefois les ganglions inguinaux présentent à leur centre un peu de caséum ou un amas de matière calcaire. On trouve parfois des tubercules conglomérés et caséux dans les poumons, le foie et la rate. Ces tubercules peuvent atteindre le volume d'un pois.

L'examen histologique montre, au niveau de l'injection, un tissu granuleux à cellules épithélioïdes et géantes, entouré de tissu conjonctif; de rares tubercules fibreux dans les poumons et les organes viscéraux.

(1) Cette Commission est composée des : Dr Anguenitski, Prof. Kutcherenki, Dr Lepiochin, Prof. Nechtchadimenko, Prof. Rewo, Dr Syssac, Prof. Sklowski, Prof. Janowski (✕) et des représentants de l'inspection de la Santé à Kiew.

Avec les doses énormes de 100 milligrammes, quelquefois même de 1 gramme, ou avec des doses moindres, plusieurs fois répétées, il arrive que les animaux succombent avec des lésions spécifiques de tuberculose, mais celles-ci ne s'accompagnent pas d'amaigrissement et elles ne sont pas réinoculables en séries à d'autres animaux.

Les injections intrapéritonéales de fortes doses (20 milligrammes) provoquent la formation de tubercules sur l'épiploon et le péritoine, mais ces tubercules ne subissent jamais d'altérations nécrotiques et ils disparaissent au bout d'un mois environ. Après deux à trois mois on ne trouve plus de lésions spécifiques, sauf dans les ganglions lymphatiques, mésentériques et inguinaux, qui restent plus longtemps infectés et dans lesquels on rencontre quelques bacilles colorables au Ziehl et morphologiquement identiques aux bacilles tuberculeux.

Après inoculation intracardiaque, il se forme des lésions tuberculeuses conglomérées ou isolées en divers organes, surtout dans les poumons; parfois de la péricardite adhésive. L'examen histologique fait constater l'existence de foyers de cellules épithélioïdes et géantes; mais, après deux mois, ceux-ci ont disparu et on ne trouve plus que du tissu fibreux. Les reins ne sont presque pas altérés.

#### ESSAIS D'EXALTATION DE LA VIRULENCE DU BCG.

Nous avons cherché à augmenter la virulence du BCG par passages de cobaye à cobaye en inoculant des émulsions d'organes apparemment très tuberculisés. Nous n'y sommes pas parvenus. Les réinoculations ne déterminaient pas de processus tuberculeux extensif.

Nous n'avons pas mieux réussi avec des ganglions infectés de lapin. Des essais dans ce sens ont été répétés sur 25 lapins. Aucun de ces animaux n'a présenté la moindre lésion.

Nous avons pu, à plusieurs reprises, obtenir des cultures en partant des organes d'animaux de passage, cobayes et lapins. Mais ces cultures de passage avaient les mêmes caractères que les cultures initiales provenant directement du laboratoire de M. Calmette ou de l'Institut Tarassewitch à Moscou.



## ESSAIS DE DISSOCIATION DE LA CULTURE BCG.

En suivant la technique de S. Pétroff, Branch et Stenken, nous avons isolé les deux types de colonies indiqués par ces auteurs (colonies R et S); nous les avons cultivés et inoculés séparément aux doses de 10, 50 et 100 milligrammes (cultures âgées d'un mois) à des cobayes. Ces animaux ont augmenté de poids et sont tous restés indemnes jusqu'après six mois et demi. Ceux que nous avons sacrifiés dans l'intervalle présentaient les lésions caractéristiques du BCG, mais pas de tuberculose extensive. Il n'y avait aucune différence de virulence entre les colonies de type S et celles de type R. Il nous est donc impossible de confirmer l'opinion de S. Pétroff qu'il existe dans le BCG des colonies virulentes.

## PROPRIÉTÉS IMMUNISANTES DU BCG.

Pour évaluer la valeur immunisante du BCG, nous avons inoculé des cobayes et des lapins par les voies hypodermique, intrapéritonéale ou intraveineuse, avec des doses uniques de 20 milligrammes ou avec des doses répétées, soit très faibles, de 0 milligr. 1 à 0 milligr. 5 et 1 milligramme, soit très fortes de 50 à 100 milligrammes. Nous éprouvions ensuite ces animaux après des délais variables de un, deux, trois, quatre et même cinq mois, avec une culture virulente (souche Vallée).

Dans l'ensemble de nos essais, dont il est inutile de donner ici les détails, nous avons constaté que les animaux prémunis survivaient assez longtemps à leurs témoins. La durée de cette survie variait de deux mois et demi à six mois et demi.

\*  
\* \*

En résumé, de nos expériences de laboratoire nous devons conclure que le BCG détermine des processus tuberculeux spécifiques dans les organes, mais que ces processus évoluent normalement vers la guérison, sauf après les inoculations de doses massives, et que les lésions ainsi produites ne sont pas réinoculables, ou du moins que, chez les animaux auxquels on

les réinocule, elles ne déterminent pas de lésions extensives.

Il nous est même arrivé d'injecter jusqu'à 4 milligr. 5 de BCG par voie intracardiaque à de tout jeunes cobayes âgés de deux jours. La santé de ces petits animaux ne souffrit pas de telles inoculations; ils se développaient et leur poids s'accroissait normalement.

#### VACCINATION DES ENFANTS A KIEW.

La Commission de Kiew chargée de l'application du BCG a commencé à vacciner des enfants à la fin de 1926. Jusqu'au 1<sup>er</sup> avril 1930, 155 nouveau-nés ont été vaccinés, dont 87 vivaient constamment en milieu tuberculeux et dans de mauvaises conditions sanitaires. Dans quelques familles, tous les enfants nés antérieurement étaient morts de méningite tuberculeuse.

Les nourrissons vaccinés ont été systématiquement surveillés. La plupart d'entre eux ont dépassé deux ans et demi. Leur développement physique a été normal pour 76 p. 100 de ceux vivant en contact infectant continu, et pour 90 p. 100 des autres.

Trois des enfants en contact ont présenté des formes bénignes de tuberculose, qui ont d'ailleurs guéri (une adénopathie trachéo-bronchique, une gomme tuberculeuse de la peau et une lésion pulmonaire).

Au total, nous avons enregistré 5 décès, dont 4 de maladies non tuberculeuses et 1 par tuberculose généralisée, confirmée par l'autopsie, dont fut isolé un bacille virulent de type humain. Ces 5 décès se sont produits exclusivement dans le groupe des enfants en contact bacillifère.

L'étude des réactions tuberculiniques chez nos vaccinés vers la fin de la première année (*cuti*, puis en cas de résultat négatif, *intradermo*) a permis de constater que celles-ci sont deux fois plus fréquemment positives chez les enfants en contact que chez ceux vivant en milieu apparemment sain (respectivement 50 p. 100 et 25 p. 100). Ces réactions se caractérisent par leur inconstance.

Les observations de la Commission de Kiew confirment l'innocuité absolue du vaccin BCG. Elles ont montré aussi

qu'on devait s'efforcer de réaliser, pendant le premier mois après la vaccination, l'isolement de la source de contagion et la surveillance sanitaire de l'enfant afin de le préserver des surinfections jusqu'à ce qu'il ait acquis l'immunité.

La Commission a constaté en outre que les cas d'infection tuberculeuse qui se sont produits chez les vaccinés restaient en général bénins. Elle a été frappée de ce fait que, non seulement la mortalité par tuberculose, mais aussi la mortalité générale, se trouvent diminuées par la vaccination.

Dans un des dispensaires de Kiew (dispensaire de Pétrovski) où l'on a vacciné régulièrement, le nombre des enfants âgés de moins de deux ans qui ont succombé à la méningite tuberculeuse a été réduit de moitié en 1929 par rapport à la période 1925-1926 où le BCG n'était pas en usage (en 1925-1926, 25 décès; en 1928-1929, 13 décès, et ces décès se sont produits chez des *non vaccinés*).

Il faut admettre que le BCG confère aux enfants vaccinés une résistance manifeste, comparativement à ce qu'on observe chez les non vaccinés.

## NOUVELLES CONTRIBUTIONS A L'ÉTUDE EXPÉRIMENTALE DU BCG

par B. ELBERT et S. GELBERG.

(*Institut de microbiologie de Minsk [Russie Blanche].*)

### I. — ISOLEMENT ET CULTURES DE PASSAGES DES BACILLES BCG DES FOYERS D'INOCULATION.

Nous avons antérieurement montré (1) que les bacilles BCG, introduits par voie parentérale dans l'organisme d'animaux de différentes espèces (cobaye, mouton), y persistent pendant longtemps, dans des foyers locaux. Depuis lors, nous en avons retrouvé après quatorze mois chez le cobaye, et jusqu'après vingt-sept mois chez le mouton.

En partant du contenu crémeux des nodules encapsulés que présentent les cobayes inoculés avec 50 milligrammes de BCG par voie intrapéritonéale ou avec 10 milligrammes par voie intratesticulaire, il nous a été possible d'obtenir, sur les milieux à l'œuf de Hohn ou de Pétroff, un assez grand nombre de cultures positives : 32 sur 90ensemencements. Même après un séjour de cent jours dans l'organisme du cobaye, nous avons obtenu 31 cultures sur 46ensemencements, soit 66 p. 100. Après un séjour plus prolongé, les cultures positives sont de plus en plus rares. Il nous est cependant arrivé d'en réussir une après deux cent quatre-vingt-quatorze jours.

Pendant les deux premières semaines après l'inoculation, on isole presque constamment, avec la plus grande facilité, le BCG des foyers locaux ; toutefois, on remarque que cet isolement se fait de moins en moins bien par l'ensemencement sur pomme de terre glycinée, alors qu'il reste aisé sur le milieu à l'œuf. Après dix-neuf jours, la semence prise dans un même foyer a fourni 3 cultures sur le milieu à l'œuf et une seule sur la pomme

(1) Ces *Annales*, 42, décembre 1928 (Supplément) et 44, janvier 1930, p. 48.



de terre. Entre cinquante et cent jours, sur 18 ensemencements, 10 ont été féconds sur l'œuf et aucun n'a fourni de développement sur pomme de terre.

Après de plus longs délais, on observe que les bacilles perdent peu à peu leur vitalité; le nombre des colonies diminue et elles mettent beaucoup plus de temps à apparaître. Avec le matériel prélevé au cours des premières semaines après l'inoculation, elles sont déjà visibles après huit à quatorze jours. Les prélèvements faits dans les foyers plus anciens (quatre-vingt-douze à quatre-vingt dix-sept jours) ne donnent pas de colonies avant la cinquième semaine et, dans un cas, l'ensemencement fait deux cent quatre-vingt-quatorze jours après l'inoculation a donné, pour 16 tubes, une seule colonie qui n'est apparue qu'après quatre-vingts jours.

Nous avons noté que les foyers testiculaires donnent plus constamment des cultures que les autres localisations.

Mais le fait le plus saillant que nos expériences ont mis en relief est que, en partant des lésions spécifiques qu'il détermine, le BCG peut être mis en évidence par les méthodes de coloration longtemps après qu'il a perdu l'aptitude à se laisser cultiver sur les milieux artificiels. Cette aptitude est, en général, perdue après environ cent jours, alors que la colorabilité dans le pus des nodules persiste jusqu'à ce que les lésions spécifiques soient résorbées.

*La perte progressive, puis totale, de l'aptitude du BCG, isolé après des temps variables de l'organisme, à se développer sur les milieux de culture, est un des caractères qui démontrent le plus nettement la stabilité de cette souche.*

## II. — CARACTÈRES DE FIXITÉ DES CULTURES DE BCG OBTENUES APRÈS LES PASSAGES SUCCESSIFS PAR L'ORGANISME ANIMAL.

Tous les expérimentateurs sont actuellement d'accord pour affirmer l'innocuité de la culture BCG, mais on discute toujours avec profit la question de savoir si cette culture est réellement inapte à récupérer de la virulence, soit par de longs séjours dans l'organisme animal (surtout lorsque la résistance de celui-ci est artificiellement diminuée), soit par les passages successifs d'animal à animal.

DÉNOMINATION de la souche	ANIMAL duquel la souche a été isolée	AVC quelle souche a été faite l'inoculation	MÉTHODE d'inoculation et dose	ORGANE ET FOYER d'où la culture a été isolée	COMBIEN DE JOURS après l'inoculation a été fait l'ensemencement	NOMBRE de cobayes inoculés avec les cultures
IA IB IC	Cobaye. Lapin. Cobaye.	BCG initial.	50 milligrammes intra-péritonéale. 10 milligrammes intra-péritonéale. 50 milligrammes intra-péritonéale.	Abcès de l'épiploon. Abcès du testicule. Abcès de l'épididyme.	7 65 97	10 4 4
IIA IIB	Cobaye.	IA	50 milligrammes intra-péritonéale. 50 milligrammes intra-péritonéale.	Ab. de l'épiploon et du gangl. mésentérique. Abcès de l'épididyme.	8 97	16 4
IIIA IIIB IIIC IIID	Cobaye.	IIA	50 milligrammes intra-péritonéale. 50 milligrammes intra-péritonéale. 50 milligrammes intra-péritonéale. 50 milligrammes intra-péritonéale.	Abcès de l'épididyme. Abcès de l'épididyme. Abcès de l'épididyme. Abcès de l'épididyme.	19 45 97 294	6 4 4 6
IVA IVB	Cobaye.	IIIA IIIB	50 milligrammes intra-péritonéale. 10 milligrammes intra-testiculaire.	Abcès de l'épididyme. Abcès du testicule.	40 63	18 5
VA VB VC	Cobaye.	IVA	40 milligrammes intra-testiculaire. 50 milligrammes intra-péritonéale. 50 milligrammes intra-péritonéale.	Abcès du testicule. Abcès de l'épididyme. Abcès de l'épididyme.	11 45 92	11 4 4
VIA VIB VIC	Cobaye.	VA	40 milligrammes intra-testiculaire. 10 milligrammes intra-testiculaire. 50 milligrammes intra-péritonéale.	Abcès du testicule. Abcès du testicule. Abcès de l'épididyme.	7 10 74	8 5 6
VIIA VIIB	Cobaye.	VI A	10 milligrammes intra-testiculaire. 40 milligrammes intra-testiculaire.	Abcès du testicule. Abcès de l'épiploon.	7 41	7 4
VIIIA VIIB VIIC	Cobaye.	VII A	10 milligrammes intra-testiculaire. 10 milligrammes intra-testiculaire. 50 milligrammes intra-péritonéale.	Abcès du testicule. Abcès du testicule. Abcès de l'épiploon.	7 14 60	8 4 5
IXA IXB	Cobaye.	VIII A	10 milligrammes intra-testiculaire. 10 milligrammes intra-testiculaire.	Abcès du testicule. Abcès du testicule.	7 17	10 5
XA	Cobaye.	IX A	10 milligrammes intra-testiculaire.	Abcès du testicule.	11	7

Dans un précédent mémoire (1) nous avons montré que ni l'affaiblissement de l'organisme du cobaye par l'administration de doses non mortelles de toxine diphtérique, ni le blocage du système réticulo-endothélial par le sucre ferrugineux avec extirpation préalable de la rate, n'exercent la moindre influence sur les caractères si particuliers des altérations spécifiques provoquées par l'inoculation de fortes doses de BCG. La même constatation a été faite par d'autres expérimentateurs, surtout par la Commission ukrainienne (rapport Tzeknowitzer), par L. Lange et Clauberg, Togounowa, M. Nasta, Leuret et Caussimon, Mauriac et Aubertin. Récemment nous avons observé que les grossesses, même répétées, et diverses maladies chroniques, qui entraînent l'amaigrissement des cobayes, n'aggravent pas non plus les lésions spécifiques bénignes produites par le BCG ou par les cultures de passages.

Ces cultures de passages, isolées après des séjours prolongés dans l'organisme des animaux, peuvent le mieux nous renseigner sur la fixité des caractères de virulence atténuée du BCG.

Pour continuer l'étude de cette question, nous avons pratiqué, à partir des organes d'animaux inoculés avec le BCG, des isollements après des temps variables, et les cultures ainsi obtenues ont été injectées aux doses de 50 milligrammes dans le péritoine ou de 10 milligrammes par voie intratesticulaire à des cobayes de 250 à 300 grammes. Ces cobayes, également sacrifiés après des temps variables, ont fourni de nouvelles séries de cultures et ainsi de suite. Nous avons pu réaliser de cette manière 10 passages successifs et étudier 25 cultures différentes.

Les résultats que ces cultures nous ont fournis sont résumés dans le tableau ci-joint (page 61).

On voit donc que nous avons pu obtenir des cultures de BCG jusqu'après 10 passages successifs par l'organisme du cobaye et jusqu'au deux cent quatre-vingt-quatorzième jour après l'inoculation. Dans 11 cas l'isolement a été fait à partir du testicule, dans 10 à partir d'un abcès de l'épididyme et dans 4 à partir de l'épiploon.

(1) Ces *Annales*, 42, décembre 1923 (Supplément), p. 97-99.

Pour avoir, autant qu'il est possible, des résultats comparables, nous avons utilisé des cobayes de même poids (250 à 300 grammes), des cultures de première ou de deuxième génération âgées de trois semaines, et des doses uniformes de 50 milligrammes pour la voie péritonéale, de 10 milligrammes pour la voie testiculaire. Il importe d'ailleurs de noter que l'inoculation intrapéritonéale de fortes doses de cultures de passages produit, chez le cobaye, ainsi que l'ont vu Korschoune, Dwijkoff et Gorokhovnikoura, des lésions plus étendues que l'inoculation sous-cutanée ou intracardiaque.

Avec chaque culture nous avons inoculé 4, 8 et parfois 20 cobayes, dont plusieurs, avant d'être sacrifiés et autopsiés, ont été gardés en observation jusqu'à un an et demi.

Nous avons étudié ainsi :

- 1° La mortalité due au processus spécifique ;
- 2° Le comportement général des animaux inoculés ;
- 3° Les caractères des lésions anatomo-pathologiques observées à des époques différentes après l'inoculation ;
- 4° La réinoculabilité des lésions spécifiques obtenues.

Nous avons tout d'abord pu constater que, sur 169 cobayes inoculés, comme nous l'avons dit, avec des doses énormes, et tenus huit à dix-huit mois en observation, *aucun n'a succombé au processus spécifique*. La gravité de celui-ci se traduit par les variations de poids. Or, il n'y a aucune différence appréciable dans les courbes des cobayes inoculés avec le BCG initial et dans celles des cobayes inoculés avec les cultures de passages, que l'inoculation ait été faite dans le péritoine ou dans le testicule.

En compulsant les procès-verbaux de chacune des autopsies, on constate tout d'abord la grande uniformité des altérations anatomo-pathologiques observées : presque toujours *nodules encapsulés*, plus ou moins volumineux, contenant un pus crémeux riche en bacilles acido-résistants et groupés sur le péritoine pariétal, au voisinage du point d'inoculation. Chez les mâles, extension des lésions aux épидидymes. L'épiploon forme habituellement un cordon induré, bordant la grande courbure de l'estomac, soudé au bord inférieur du foie et à l'anse contiguë de l'intestin grêle. La capsule des nodules s'épaissit et se densifie avec le temps.



Chez quelques animaux, on trouve quelques petits nodules isolés, grisâtres ou jaunâtres, à la surface du foie, du diaphragme, ou sur le mésentère, la rate, la surface de l'intestin, des reins ou de la vessie, mais jamais dans le parenchyme même des organes. Nous n'en avons pas rencontré sur les poumons, sur la plèvre ni sur le péricarde. Une seule fois nous avons trouvé un abcès dans un ganglion mésentérique.

Ces diverses lésions persistent très longtemps dans l'organisme des cobayes, mais sans aucune tendance extensive. Elles régressent peu à peu et se transforment en tissu cicatriciel dense. *Cette régression s'observe aussi régulièrement avec les cultures de passages qu'avec le BCG initial.*

Dans toutes nos expériences, la réinoculation du pus contenu dans les nodules à des animaux sains, et celle des émulsions de pulpe d'organes contenant les lésions décrites ci-dessus, sont restées sans résultat ou n'ont produit que de petits nodules isolés sur le foie, la rate et le diaphragme.

Nos tentatives pour renforcer la virulence d'une des souches que nous avons étudiées (IV A) par passages par le testicule du cobaye sont également demeurées vaines. Le testicule inoculé était augmenté de volume, induré; il présentait généralement un abcès central contenant du pus crémeux et entouré d'une capsule de cellules épithélioïdes et géantes. Ce pus, réinoculé dans le testicule de nouveaux cobayes sains, est resté inoffensif même pour trois de nos animaux autopsiés respectivement après quarante, deux cent quatre-vingt-treize et trois cent vingt-trois jours.

#### CONCLUSIONS.

L'observation prolongée d'un grand nombre de cobayes inoculés soit avec le BCG initial aux doses massives de 50 milligrammes par voie péritonéale ou de 10 milligrammes par voie intratesticulaire, et celle de 169 cobayes, inoculés aux mêmes doses, avec 25 cultures différentes de 10 passages successifs, n'a fait constater aucun renforcement de virulence par rapport à la souche initiale.

La souche BCG s'est montrée d'une parfaite stabilité dans toutes nos expériences.

## CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE L'INNOCUITÉ DU BCG CHEZ LE NOURRISSON

par R. CHAUSSINAND et G. TEMPÉ.

Quoique, à de très rares exceptions près, l'innocuité du BCG soit actuellement admise par tous les auteurs, nous croyons néanmoins devoir publier les observations suivantes qui contribuent à rendre cette innocuité encore plus évidente.

Nous avons expérimenté l'injection *intrapéritonéale* de BCG chez un nourrisson âgé de sept mois. Cette expérience fut tentée, non dans un but de prémunition contre la tuberculose, mais pour démontrer l'innocuité du BCG. On sait que, par rapport aux voies buccale et sous-cutanée, cette méthode de vaccination provoque chez les animaux de laboratoire des lésions plus importantes, quoique bénignes. Donc si le BCG devait être dangereux pour l'enfant, il le serait surtout par injection intrapéritonéale.

Pour démontrer l'innocuité du BCG chez le nourrisson, nous avons injecté 2 milligrammes de BCG dans le péritoine d'un monstre hydrocéphale, âgé de sept mois. Le sujet, né par césarienne, le 24 septembre 1928, présentait dès sa naissance un tour de tête de 60 centimètres pour une taille de 57 centimètres. Cet enfant, dont la survie était ignorée de la mère, fut hospitalisé, dès sa venue au monde, à la *Clinique infantile de Strasbourg*. Le 23 avril 1929, il reçut 2 milligrammes de BCG intrapéritonéal. Nous nous sommes servis de l'émulsion BCG-SC (0 milligr. 025 par centimètre cube), dont il lui fut injecté 80 cent. cubes. Nous avons ainsi la certitude que le BCG se trouvait dispersé dans toute la cavité péritonéale. L'enfant supporta très bien cette injection et il ne fit, par la suite, ni réaction thermique, ni chute de poids. Les jours suivants le BCG ne fut retrouvé ni dans les selles, ni dans les urines. Quinze jours après l'injection du vaccin, l'enfant présenta une cuti-réaction faible qui devint fortement positive le vingt-neu-

vième jour. Trente-huit jours après, il fit, au point d'injection, un abcès froid sous-cutané de la dimension d'une noisette qui provenait certainement de germes-vaccin injectés dans le tissu sous-cutané en retirant l'aiguille. Cet abcès était, en effet, mobile et ne communiquait pas avec la cavité péritonéale. Dans le pus séreux on retrouva des bacilles acido-résistants et son inoculation au cobaye fut négative. Le 10 juillet 1929, donc soixante-dix-huit jours après l'injection de BCG, l'enfant fut transféré par son père à la *Clinique infantile de Bâle* (professeur Wieland) par crainte que la mère apprenne, à Strasbourg, la survie de l'enfant. Au départ, le tour de tête de cet hydrocéphale était de 80 centimètres. L'abcès froid de la paroi abdominale était guéri et la cuti-réaction se montra encore fortement positive. A Bâle, cet enfant servit à des expériences sur le Vigantol (Ergostérine irradiée). Il reçut en tout environ 600 cent. cubes de cette substance, par injection intramusculaire journalière de 20 cent. cubes. Le 24 août 1929, il décéda, c'est-à-dire quatre mois après l'inoculation de BCG. M. von der Mühle a bien voulu nous envoyer de Bâle les renseignements suivants : l'enfant est mort sans avoir présenté de symptômes alarmants auparavant. Le ventre est toujours resté souple et les selles ont toujours été normales. Il n'a jamais fait d'hyperthermie et le pouls a toujours été régulier. L'opinion de la Clinique infantile de Bâle est que cet enfant a succombé du fait de son hydrocéphalie ou à la suite de l'injection formidable de Vigantol (600 cent. cubes!) qu'il avait reçue.

A l'autopsie, les organes de la cavité abdominale (foie, rate et reins) présentaient de minuscules follicules dans lesquels le bacille ne fut pas retrouvé. Ni ces follicules, ni les ganglions mésentériques n'étaient caséifiés. L'inoculation des ganglions mésentériques aux cobayes fut négative. Le cerveau, les méninges et les organes de la cavité thoracique étaient restés intacts. A noter que, malgré la très forte injection de Vigantol, on n'a trouvé chez cet enfant aucune trace de calcification.

En résumé : Le BCG, injecté à la forte dose de 2 milligrammes dans le péritoine, n'avait en rien modifié l'état de santé du sujet. En quatre mois, le BCG n'avait produit aucune lésion évolutive et les lésions étaient restées localisées dans la cavité abdominale. Les altérations constatées à l'autopsie étaient de

nature bénigne et ne montraient aucune trace de caséification. Elles étaient identiques à celles trouvées par les différents auteurs sur les animaux de laboratoire vaccinés par le BCG intrapéritonéal. Or, on sait que ces lésions régressent chez ces animaux après un certain temps. Il est donc très probable que les altérations bénignes, constatées chez cet hydrocéphale, auraient même pu disparaître complètement si l'enfant avait vécu plus longtemps.

*Il est permis d'affirmer que l'inoculation intrapéritonéale de 2 milligrammes de BCG a été sans danger pour ce nourrisson.* Et, en se basant sur les nombreuses expériences faites sur les animaux de laboratoire, on peut déclarer, à plus forte raison, que la vaccination des enfants au BCG par les voies buccale et sous-cutanée est absolument inoffensive avec les doses actuellement employées.

Pour chercher à nous rendre compte si le BCG absorbé à forte dose pouvait provoquer des troubles digestifs chez le nouveau-né, nous avons fait l'essai de vaccination suivant :

B... (Léonie), née, le 4 octobre 1929, de mère gravement tuberculeuse, pesait 3.560 grammes et présentait une constitution normale. Cette enfant nous fut adressée immédiatement après sa naissance pour vaccination au BCG. Nous décidâmes d'augmenter la dose vaccinale. *L'enfant reçut journellement 10 milligrammes de BCG per os, du quatrième au neuvième jour après sa naissance, donc au total : 60 milligrammes de BCG.* Elle fut nourrie au lait de femme afin que nous pussions éliminer une dyspepsie éventuelle due à un allaitement artificiel mal supporté. Les jours suivants les selles restèrent normales et l'enfant prospéra bien. Douze jours après l'ingestion de la dernière dose de BCG, la cuti-réaction fut négative. Entre temps, la salle dans laquelle se trouvait notre vaccinée fut infectée de coqueluche par un nourrisson admis en période d'incubation. Le 28 octobre, l'enfant vaccinée commença à tousser et, présentant de légères quintes six jours après, elle fut transférée au service de coqueluche. On substitua au lait de femme du babeurre. Malgré sa coqueluche et le sevrage, l'enfant augmenta régulièrement de poids et les selles restèrent normales. Le 16 novembre, une intradermo-réaction avec 0 milligr. 1 de tuberculine purifiée donna un résultat douteux, mais, un mois plus tard, la



cuti-réaction se montra fortement positive. Le 20 décembre, l'enfant ne toussait plus et se portait bien. Elle fut transférée, avec un poids de 4.840 grammes, dans un service de nourrissons où la radiographie de ses poumons donna une image normale. Le 24 décembre, elle fit une otite purulente suivie, le lendemain, d'une dyspepsie secondaire. Les selles s'améliorèrent rapidement par le traitement au lait albumineux et elles étaient redevenues normales le 31 décembre. A partir du 18 janvier 1930, l'enfant reçut la nourriture normale pour son âge. Le 16 février, nouvelle otite sans aucun retentissement sur l'appareil digestif. Enfin, du 12 au 24 mars, l'enfant fit une broncho-pneumonie bilatérale grave, la température atteignant 40°. Le 13 mars, l'enfant présentait, jusque pendant cinq heures, des crises convulsives cloniques et toniques. Depuis le 21 mars, la fillette se porta très bien, ne toussa plus et le poids, qui avait un peu diminué pendant sa broncho-pneumonie, augmenta normalement. Le 12 avril, l'enfant, âgée de six mois et huit jours, pesait 6.480 grammes et l'image radiologique de ses poumons était normale.

Nous voyons donc *qu'un nouveau-né peut supporter la forte dose de 60 milligrammes de BCG per os sans qu'un trouble digestif se déclare*. Nous rappelons qu'en plus, notre vaccinée avait été infectée par une *coqueluche*, quinze jours après l'ingestion de la dernière dose de BCG, sans que cette maladie anergisante ait provoqué le moindre incident. Elle supporta, en outre, une *otite* suivie de *dyspepsie*, ainsi qu'une *broncho-pneumonie* grave. *On peut donc affirmer que l'absorption de 60 milligrammes de BCG n'a, non seulement pas provoqué d'accidents, mais pas même diminué la résistance de l'enfant.*

Pour contribuer à la démonstration du *caractère stable du BCG dans l'organisme des nourrissons*, nous avons fait les essais de vaccination suivants :

Chez un nourrisson hérédo-syphilitique, vacciné, le 27 avril 1929, par deux injections sous-cutanées simultanées de 0 milligr. 0125 de BCG (total : 0 milligr. 025), nous avons, le 19 décembre 1929, retiré par ponction quelques gouttes de pus de l'infiltration qui s'était formée à l'un des points d'injection (voir *Ces Annales*, 44, n° 4, 1930, p. 454). Ce pus fut immédiatementensemencé par l'un de nous sur pomme de terre glycé-

rinée. L'ensemencement sur milieux ordinaires démontra que ce pus, dû au BCG, ne contenait pas d'autres germes. Un mois après, on ne nota sur les milieux pomme de terre glycélinée aucune culture apparente. Le 2 février 1930, par contre, on put observer un début de culture caractéristique dans la plupart des tubes ensemencés. A l'examen direct on constata qu'il s'agissait d'un bacille acido-résistant. A ce moment, fut fait un repiquage de la culture sur pomme de terre glycélinée, ainsi qu'une inoculation sous-cutanée de 20 milligrammes à deux cobayes. De ce repiquage on obtint une culture abondante et normale, dont, le 25 février 1930, on prépara avec de l'eau physiologique une émulsion bacillaire, aussi homogène que possible, titrée à 3 milligrammes de bacilles (pesés à l'état frais) par centimètre cube. L'émulsion fut contrôlée et on n'y trouva pas de microbes de contamination. Les cobayes inoculés le 2 février ne présentaient, de leur côté, pas d'adénite spécifique. Cette émulsion de BCG servit à préparer, le 26 février 1930, une dilution dans de l'eau physiologique, titrée à 0 milligr. 025 par centimètre cube.

Un nouveau-né et un prématuré âgé de deux mois, mais hospitalisé à la Clinique infantile depuis sa naissance, reçurent chacun *deux injections simultanées de 0 milligr. 025 de ce BCG (total : 0 milligr. 05)* dans le tissu sous-cutané situé au niveau des deux omoplates. Le nouveau-né montra, par la suite, au début de la sixième semaine, une cuti-réaction positive, et la réaction locale consista en deux et trois petits nodules, de la dimension d'un grain de millet, à chaque point d'injection des bacilles. Le prématuré ne réagit à la cuti-réaction que dans la dixième semaine qui suivit la vaccination et les réactions locales consistaient en deux nodules, gros comme un pois. Chez aucun des deux vaccinés, qui sont restés en parfaite santé, il ne s'est formé d'infiltration locale et aucune réaction ganglionnaire n'a pu être constatée. Les cobayes inoculés avec 20 milligrammes de ce même bacille se portent bien, plus de quinze semaines après l'inoculation, et n'ont présenté aucune lésion locale.

Nous rappelons qu'à la dose totale de 0 milligr. 05 de BCG normal administrée par deux injections simultanées sous la peau, la cuti-réaction apparaît régulièrement vers la sixième

semaine et que, localement, on note généralement la formation d'une infiltration qui régresse en nodule (v. Ces *Annales*, 44, n° 4, 1930). Chez l'un de ces enfants, par contre, l'allergie apparut plus tardivement, et chez les deux vaccinés les réactions locales furent nettement plus faibles. *On peut donc affirmer que, malgré un séjour de plus de cinq mois dans l'organisme d'un hérédo-syphilitique et après culture et repiquage sur pomme de terre glycinée, le BCG non seulement n'a pas récupéré sa virulence initiale, mais semble plutôt avoir subi une légère atténuation.*

Etant donnés les doses et modes de vaccination employés, il apparaîtra que les observations qui précèdent sont à considérer comme preuves de l'innocuité du BCG administré aux doses et par les voies habituelles.

*(Clinique infantile du professeur Rohmer  
et Institut de bactériologie du professeur Borrel.)*

## ESSAIS DE VACCINATION AU BCG DE JEUNES ENFANTS PAR VOIE INTRAMUSCULAIRE,

par ROLAND CHAUSSINAND.

*(Clinique infantile du professeur Rohmer, Strasbourg.)*

Sur la suggestion du professeur Calmette, nous avons expérimenté la voie intramusculaire pour la vaccination au BCG des jeunes enfants. Ce mode d'injection avait déjà été employé par M<sup>me</sup> Delanoë chez des lépreux, et l'inoculation de fortes doses de BCG par cette voie ne semblait pas avoir déterminé la formation d'abcès froids.

Nous avons vacciné un total de 17 enfants par voie intramusculaire. A part deux nouveau-nés, envoyés spécialement pour vaccination au BCG, tous ces enfants, convalescents de diverses maladies, se trouvaient déjà depuis un certain temps hospitalisés à la clinique. Ils ne présentaient pas d'antécédents tuberculeux connus et, lors de leur admission, n'avaient pas réagi à la cuti-réaction. Chez chacun d'entre eux, avant de procéder à la vaccination, nous avons recherché à nouveau l'allergie à la tuberculine. Pour treize sujets, isolés à la clinique de tout contact tuberculeux depuis plus de trois semaines, nous nous sommes contentés de pratiquer une deuxième cuti-réaction. Deux autres enfants, par contre, isolés respectivement douze et vingt et un jours seulement, furent éprouvés par intradermo-réaction de 1 milligramme de tuberculine purifiée. Aucun de ces quinze enfants n'a réagi aux doses employées.

Nous décidâmes d'injecter des doses de BCG variant de 0 milligr. 02 à 0 milligr. 1, doses que nous avons déjà employées pour la vaccination par voie sous-cutanée, ce qui nous permettait ainsi de comparer les résultats obtenus. Les doses de BCG, le volume de l'émulsion vaccinale injectée, ainsi que la durée de l'isolement pré-vaccinal se trouvent indiqués dans nos tableaux et pour chaque enfant. En outre, nous avons



divisés nos 17 vaccinés en deux groupes : *groupe A* (tableau I), 8 enfants vaccinés par une injection intramusculaire de 0 milligr. 02 à 0 milligr. 1 de BCG; et *groupe B* (tableau II), 9 enfants vaccinés aux mêmes doses, mais par deux injections intramusculaires simultanées.

#### GRUPE A (tableau I).

Le groupe A comprend 8 enfants âgés, au moment de leur vaccination, de quatre jours à dix-sept mois. Tous ont reçu, dans le muscle de la fesse gauche, *une injection unique de BCG* à des doses variant entre 0 milligr. 02 et 0 milligr. 1 (volume de l'émulsion vaccinale : 1 cent. cube à 5 cent. cubes).

Les enfants vaccinés par 0 milligr. 05 et 0 milligr. 1 ont tous présenté une cuti-réaction positive dans un délai de trois à quatre semaines. Dans certains cas, l'allergie est même apparue de huit à quinze jours après la vaccination, mais, à ces dates, elle n'était encore décelable que par une injection intradermique de 1 milligramme de tuberculine purifiée. On voit donc que l'allergie est plus précoce après vaccination par voie intramusculaire qu'après l'injection de BCG sous-cutanée, où — à la même dose — la cuti-réaction ne devient positive qu'au bout de six semaines environ. Dans la majorité des cas elle semble aussi plus intense.

Le nouveau-né vacciné par 0 milligr. 02 de BCG (n° 1) ne montra qu'une cuti-réaction douteuse au bout de cinq semaines, mais dès la troisième semaine il avait présenté une intradermoréaction positive avec 1 milligramme de tuberculine purifiée, c'est-à-dire au moins trois semaines plus tôt qu'après l'injection sous-cutanée d'une même dose de BCG.

Les réactions locales furent également plus fortes que celles observées dans la vaccination sous-cutanée. Sur huit vaccinés, cinq ont fait des abcès froids deux mois environ après la vaccination. On a retiré de ces abcès par ponction jusqu'à 20 cent. cubes d'un pus séreux et bien lié. L'examen et la culture de ce pus ont montré qu'il contenait des bacilles acido-résistants à l'exclusion de tout autre germe. Ces abcès se reformaient, en général, au bout de quelques jours et nécessitaient plusieurs ponctions. Ils n'étaient pas douloureux sauf chez le sujet n° 8

TABLEAU I. — Groupe A : Huit nourrissons vaccinés au BCG par une injection intramusculaire.

NUMÉRO	ÂGE	DURÉE de l'isolement de la prévacculaire	DOSE de BCG en milligr.	VOLUME de l'injection vaccinale en cent. cubes	DURÉE DE LA PÉRIODE PRÉALLERGIQUE EN SEMAINES						RÉACTIONS LOCALES
					2	3	4	5	6	10	
1	4 jours.	4 jours.	0,02	2	C — m —	M +	m ?	C ?			Infiltration (diamètre : 2 centimètres) après cinq semaines. Reste en observation.
2	8 mois.	11 semaines.	0,05	1	M ?	C +	C +		C ++		Abcès froid, après huit semaines (18 cent. cubes de pus). Fistule.
3	17 mois.	18 semaines.	0,05	2	M ?	C ?	C +			C ++	Abcès froid, après sept semaines (15 cent. cubes de pus).
4	6 mois 1/2.	5 mois 1/2.	0,05	5	M +	C +		Décédé après trente-quatre jours à la suite de broncho-pneumonie banale (autopsie). Légère infiltration locale (2 centimètres de diamètre).			
5	16 mois.	6 mois 1/2.	0,05	5	M ?		C +			C +	Abcès froid, après neuf semaines (2 cent. cubes de pus).
6	16 mois.	6 mois 1/2.	0,1	2	M ?		C +			C +	Abcès froid, après huit semaines (5 cent. cubes de pus).
7	9 mois.	8 mois.	0,1	2	M ?	C +				C ++	Infiltration (3 centimètres de diamètre), en régression.
8	1 an.	4 mois.	0,1	2	M ++	C ?	C ++			C ++	Abcès froid, après cinquante jours (20 cent. cubes de pus).

C, cuti-réaction; m, intradermo-réaction (0 milligr. 1 de tuberculine purifiée); M, intradermo-réaction (1 milligramme de tuberculine purifiée); ++, fortement positive; +, positive; ?, douteuse; —, négative.

(compression nerveuse?) qui avait en outre présenté, pendant deux semaines, une légère élévation thermique n'ayant pas dépassé 38°. Chez ce même enfant nous avons constaté une anorexie marquée, débutant quinze jours environ après l'injection du BCG et qui n'a cessé que quelque temps après la ponction de l'abcès froid. Tous les autres vaccinés n'ont pas souffert du fait de l'abcès qui ne gênait pas leurs mouvements et n'influait en rien leur croissance pondérale. Chez le n° 2, l'abcès s'est fistulisé et chez le n° 3 il s'est infecté secondairement par du staphylocoque doré hémolytique.

Les trois enfants de ce groupe n'ayant pas fait d'abcès froid sont : le n° 1 qui, vacciné par 0 milligr. 02 seulement, ne montrait, cinq semaines après, qu'une infiltration du muscle de 2 centimètres de diamètre. Cet enfant est encore actuellement en observation au service. Le n° 4, un hydrocéphale avec *spina bifida* et malformations multiples, est mort trente-quatre jours après sa vaccination, d'une broncho-pneumonie suraiguë d'origine banale. L'autopsie ne révéla rien qui pût être invoqué contre le BCG. Localement on trouva une infiltration du muscle de 2 centimètres de diamètre. Enfin, le n° 7 présenta une infiltration locale de 3 centimètres de diamètre qui a régressé lentement à partir de la septième semaine.

D'autre part, sur d'anciens vaccinés *per os*, nous avons effectué trois revaccinations à la dose de 0 milligr. 01 intramusculaire, sans qu'il s'en soit suivi ni allergie, ni réaction locale.

#### GROUPE B (*tableau II*).

Les 9 enfants du groupe B, âgés au moment de la vaccination de quinze jours à trente-trois mois, ont reçu les mêmes doses de BCG que les précédents, mais en *deux injections simultanées*, dans les muscles des deux fesses.

En comparant les *tableaux I et II*, nous voyons que les deux groupes se comportent sensiblement de la même façon au point de vue de l'allergie. En effet, *tous* les enfants du groupe B — à l'exception d'un nouveau-né (n° 1) vacciné au total par 0 milligr. 02 — ont présenté une cuti-réaction positive au bout de *trois à quatre semaines*.

Par contre, après deux injections simultanées, les abcès froids

NUMÉRO	ÂGE	DURÉE de l'isolement prévacinal	DOSE de BCG en milligr.	VOLUME de l'émulsion vaccinale en cent. cubes	DURÉE DE LA PÉRIODE PRÉALLERGIQUE EN SEMAINES								RÉACTIONS LOCALES
					2	3	4	5	6	→	10	11	
1	45 jours.	15 jours.	0,01 0,01	1 1		C — m ?	M +	M +	C + ?	→			Pas de réactions locales après six semaines. Reste en observation.
2	3 mois.	3 mois.	0,01 0,01	1 1	M —		C +		C +	→	C ++		Petite infiltration, résorbée après six semaines.
3	1 mois 1/2.	24 jours.	0,01 0,01	1 1	M ?		C +		C +	→	m ++		Petite infiltration, résorbée après cinq semaines.
4	5 mois 1/2.	5 mois.	0,025 0,025	2,5 2,5	M +	C ++				→	C +		Petites infiltrations, résorbées après quatre semaines.
5	2 ans 3/4.	12 jours.	0,025 0,025	2,5 2,5		M —	C +		C ++				Petite infiltration, résorbée après six semaines.
6	3 mois.	26 jours.	0,025 0,025	2,5 2,5	M ++	C ++				Décédé de méningite tuberculeuse et granulie après soixante-quatre jours.			
7	2 ans 1/3.	31 jours.	0,025 0,025	1 1	M +	C ++				→	C ++		<i>Abcès froid</i> à gauche (3 cent. cubes de pus), après huit semaines. Légère infiltration à droite.
8	8 mois.	50 jours.	0,05 0,05	1 1	M +	C ++				→	C ++		Infiltrations, plus forte à gauche (diamètre : 3 centimètres). Régressent après dix semaines.
9	3 mois.	2 mois 1/2.	0,05 0,05	1 1	M —	C ?	C +			→	C ++		Infiltration à gauche (diamètre : 4 centimètres) ; ponction : négative. Infiltration à droite (diamètre : 2 centimètres) ; les deux en régression.

C, cuti réaction; m, intradermo-réaction (0 milligr. 1 de tuberculine purifiée); M, intradermo-réaction (1 milligramme de tuberculine purifiée); ++, fortement positive; +, positive; ?, douteuse; —, négative.

*Abcès froid* à gauche (3 cent cubes de pus) après huit semaines. Légère infiltration à droite.

Infiltrations, plus forte à gauche (diamètre : 3 centimètres). Régressent après dix semaines.

Infiltration à gauche (diamètre : 4 centimètres); ponction : négative. Infiltration à droite (diamètre : 2 centimètres); les deux en régression.



ont été beaucoup plus rares. Seul le n° 7 présenta, au bout de huit semaines et à l'un des points d'injection (à gauche), un abcès froid qui ne nécessita qu'une seule ponction évacuatrice (3 cent. cubes de pus). Les autres enfants n'ont fait que des *infiltrations locales*, dont l'importance était généralement en rapport avec la dose de BCG injectée et qui, onze semaines plus tard, étaient en voie de régression marquée ou avaient même disparu. Comme dans la vaccination par voie sous-cutanée, on ne trouvait parfois qu'une seule infiltration à l'un des points d'injection, ou bien, quand deux infiltrations se formaient, l'une était toujours plus importante que l'autre. Chez l'enfant n° 9 qui présentait à gauche une infiltration de 4 centimètres de diamètre, nous avons ponctionné, vers la neuvième semaine, sans trouver de pus. Actuellement, on constate chez cet enfant une régression nette de l'infiltration. Dans ce groupe nous n'avons observé ni hyperthermie, ni anorexie consécutives à la vaccination.

Par contre, nous avons constaté un décès par méningite tuberculeuse chez un enfant de ce groupe (n° 6), dont nous allons résumer l'observation :

D... (Raymond), né le 8 septembre 1929 et admis le 15 janvier 1930 à la clinique pour rachitisme et spasmodophilie, présentait une cuti-réaction négative. Les parents nous ayant déclaré que l'enfant provenait d'un milieu sain, nous décidâmes de le vacciner au BCG par voie intramusculaire dès qu'il serait guéri de sa spasmodophilie. Après un séjour de vingt-six jours à la clinique, une deuxième cuti-réaction se révéla également négative. L'enfant reçut alors 0 milligr. 05 de BCG en deux injections intramusculaires simultanées de 0 milligr. 025 chacune. Deux semaines après, l'intradermo-réaction (4 milligramme de tuberculine purifiée) fut très fortement positive. La cuti-réaction pratiquée sept jours plus tard fut également très forte. Quelques jours après la vaccination débuta une hyperthermie, dépassant rarement 38°, qui persista par la suite. L'enfant présentant des râles de bronchite à l'auscultation vingt-quatre jours après la vaccination, nous fîmes une radiographie des poumons qui nous montra une adénopathie trachéo-bronchique et, vers le sommet gauche, une grosse ombre oblongue parahilaire, image suspecte de tuberculose. Pris de

doutes au sujet de l'état présumé non tuberculeux de l'enfant avant la vaccination, nous nous sommes livrés à une enquête et avons appris que son grand-père maternel venait de mourir quinze jours auparavant, à la clinique médicale A (professeur Merklen), de tuberculose pulmonaire bilatérale (bacilles de Koch dans les crachats : ++ ) et que notre vacciné s'était trouvé dès sa naissance en contact intime avec lui. Cinquante-quatre jours après la vaccination, l'enfant présenta des symptômes méningés et une ponction lombaire décéla des bacilles de Koch dans le liquide céphalo-rachidien. Enfin, soixante-quatre jours après la vaccination, cet enfant décéda. L'autopsie montra une méningite tuberculeuse basale avec épendymite tuberculeuse très marquée. Aux deux poumons, on constatait une granulie très discrète et à gauche, à la partie centrale du sommet, une masse caséuse ferme, grosse comme un noyau de cerise, entourée d'une coque scléreuse. En outre, un foyer d'alvéolite entourait le foyer caséux et un autre foyer d'alvéolite, située dans la partie médiastine du poumon gauche, allait jusqu'au hile. On nota également quelques plages caséuses aux ganglions médiastinaux. Foie et rate étaient indemnes. Pas de lésions locales aux points d'injection du vaccin.

Dans le cas de cet enfant, contaminé avant la vaccination, mais ne réagissant pas à la cuti-réaction, on peut se demander si l'injection de BCG n'a pas favorisé la dissémination du bacille de Koch virulent. D'après ce que nous savons sur l'action du BCG chez les tuberculeux — il est vrai adultes — on pourrait admettre que le BCG n'ait pas déterminé cette évolution maligne. Nous ne pouvons rien affirmer et nous nous bornons à signaler le fait. En tous cas, dans un accident de ce genre, l'entourage de l'enfant sera toujours tenté d'attribuer le décès aux suites de la vaccination.

Il faut conclure de cette observation que, pour la vaccination et même la revaccination d'enfants ayant déjà vécu en contact bacillifère, une prudence extrême doit être observée. *L'enfant doit être isolé avant la vaccination* — comme le préconisait déjà Wallgren — *pendant au moins six à huit semaines* de tout contact tuberculeux et l'allergie doit être recherchée par *l'intra-dermo-réaction avec de fortes doses de tuberculine*. *Un enfant allergique ne sera ni vacciné, ni revacciné*. De plus, l'isolement

du sujet devra être prolongé *après la vaccination* jusqu'à l'apparition de l'allergie.

Nous venons de voir que la voie intramusculaire semble déterminer plus fréquemment l'abcès froid que la voie sous-cutanée. Mais on constate l'avantage manifeste du système des *deux injections simultanées*, qui, aux mêmes doses, ne provoque que rarement la formation d'un abcès froid.

*Le seul avantage de la voie intramusculaire sur les autres modes d'administration du BCG, c'est l'apparition rapide de l'allergie.* En effet, avec des doses de 0 milligr. 05 et même quelquefois de 0 milligr. 02, on obtient, en général, une *cuti-réaction positive au bout de trois à quatre semaines*, alors que, par voie sous-cutanée, cette même réaction n'est positive que vers la sixième semaine. *La voie intramusculaire, par deux injections simultanées de 0 milligr. 025 de BCG chacune, pourrait donc rendre des services dans la prémunition de nouveau-nés qui ne peuvent être isolés de leur milieu bacillifère et chez lesquels il y aura intérêt à produire rapidement l'immunité.*

#### BIBLIOGRAPHIE

- CHAUSSINAND (R.), Contribution à l'étude de l'allergie à la tuberculine sur les sujets vaccinés au BCG par voie sous-cutanée. *Ces Annales*, **44**, n° 4, 1930, p. 450-469.
- WALLGREN (A.), Résultats de la vaccination intracutanée contre la tuberculose au moyen du BCG. *Ces Annales*, **43**, n° 6, 1929, p. 799-808.

## QUELQUES FAITS RELATIFS A LA VACCINATION PRÉVENTIVE CONTRE LA TUBERCULOSE PAR LE BCG EN GRÈCE

par le Professeur Ε. Ν. LAMPADARIOS,  
Directeur du Centre d'Hygiène sociale de la Croix-Rouge Hellénique.

Il n'est pas dans notre intention d'exposer ici l'ensemble des résultats, d'ailleurs très favorables, que nous avons obtenus en Grèce de l'application de la prémunition des nouveau-nés par le BCG.

Nous désirons simplement relater dans cette note une enquête que nous avons entreprise avec le concours dévoué de M<sup>lle</sup> Vasilopoulo, inspectrice générale des infirmières-visiteuses de la Croix-Rouge Hellénique, à l'instigation de M. le Docteur J. Valtis et qui, par la manière dont elle a été conduite, équivaut à une expérience de laboratoire.

Nous avons essayé de préciser le degré d'immunité que confère le BCG en exposant des enfants prémunis à des contacts familiaux bacillifères prolongés, d'une durée variant de cinq à quarante-huit mois, et contrôlés par des examens des crachats répétés tous les vingt-cinq jours.

Nous tenons dès le début à faire ressortir les difficultés qu'offre une telle entreprise, les parents cracheurs de bacilles se dérochant trop souvent aux examens nécessaires répétés.

Notre enquête a porté sur 60 enfants appartenant à un milieu social où l'hygiène était presque inexistante. Sur ce nombre nous n'en retiendrons que 22 dont les parents ont consenti à se soumettre à tous les examens cliniques et de laboratoire que nous leur avons demandés.

Ces 22 enfants ont été suivis par les infirmières-visiteuses de la Croix-Rouge Hellénique. Nous donnons ci-après un résumé de leur observation en les partageant en deux groupes.

Le premier comprend 16 enfants *nés dans un milieu familial*



*bacillifère*. Ces enfants, prémunis par le BCG pendant les dix premiers jours après leur naissance, ont été séparés du foyer infectant pendant un mois, puis exposés à un contact bacillifère prolongé, sévèrement contrôlé.

Le second groupe comprend 5 enfants *nés dans un milieu apparemment sain*. Ces enfants, vaccinés pendant les dix premiers jours après leur naissance, ont été dans la suite, et après un délai plus ou moins long, exposés pendant une période prolongée à un contact bacillifère.

PREMIER GROUPE : ENFANTS VACCINÉS,  
EXPOSÉS AU CONTACT BACILLIFÈRE.

1<sup>o</sup> Enfant C... (Georges), né en mars 1927. Vacciné pendant les dix premiers jours après sa naissance par le BCG; revacciné à la fin de la première et de la troisième année. A vécu dès l'âge d'un mois et en permanence avec son père tuberculeux bacillifère. A fait une angine à l'âge d'un an, puis a été atteint de la dengue à l'âge de dix-huit mois. Il s'est développé normalement et est actuellement en parfait état de santé (trois ans et trois mois).

2<sup>o</sup> Enfant F... (Théodore), né le 12 avril 1928. Vacciné dès la naissance, puis à la fin de la première année. Est resté pendant cinq mois en contact avec son père constamment bacillifère.

A fait une bronchite à la fin du sixième mois. L'enfant s'est développé normalement et présente un bon état général (deux ans et deux mois).

3<sup>o</sup> Enfant M... (Sigmonde), née en novembre 1928. Vaccinée dès la naissance et à la fin de la première année. Est restée en contact avec son père constamment bacillifère qui est décédé six mois après la naissance de l'enfant. N'a jamais été malade. S'est très bien développée et reste en parfait état de santé (un an et sept mois).

4<sup>o</sup> Enfant Ch... (Adamantia), née le 11 octobre 1927. Vaccinée dès la naissance et à la fin de la première année. Est restée en contact avec son père bacillifère qui est décédé six mois après la naissance de l'enfant. La mère présente des crises d'asthme. L'enfant a fait une grippe à la fin de la première année; il a été atteint de coqueluche, puis de la dengue à l'âge de deux ans.

Il s'est très bien développé et est actuellement en parfait état de santé (deux ans et huit mois).

5° Enfant Ch... (Basile), né le 4 mars 1928. Vacciné dès la naissance et à la fin de la première année. En contact avec père bacillaire pendant dix mois. Le père est décédé en janvier 1929. L'enfant a fait une bronchite à l'âge d'un an. Il s'est développé normalement et est actuellement très bien portant (deux ans et quatre mois).

6° Enfant Ch... (Aristide), né le 22 décembre 1928. Vacciné dès la naissance et revacciné à la fin de la première année. En contact permanent avec père bacillifère qui est décédé en août 1929. L'enfant est actuellement très bien portant et n'a jamais été malade (un an et six mois).

7° Enfant M... (Catina), née le 11 février 1926. Vaccinée dès la naissance et à la fin de la première année. En contact permanent avec mère bacillifère. Allaitement artificiel dès le début. S'est très bien développée; n'a jamais été malade et se porte actuellement très bien (quatre ans et quatre mois).

8° Enfant G... (Nicolas), né en mai 1928. Vacciné dès la naissance et à la fin de la première année. En contact permanent avec mère bacillifère. L'enfant présente actuellement un parfait état de santé (deux ans et un mois).

9° Enfant D... (Kety), née en avril 1927. Vaccinée dès la naissance et à la fin de la première année. Contact permanent avec père tuberculeux bacillifère, qui avait eu une hémoptysie au moment de la naissance de l'enfant. Celui-ci est actuellement très bien portant et n'a jamais été malade (trois ans et deux mois).

10° Enfant G... (André), né en 1928. Vacciné dès la naissance. Contact permanent avec père et mère tuberculeux et bacillifères.

L'enfant est actuellement très bien portant (deux ans).

11° Enfant P... (Christos), né le 24 septembre 1929. Vacciné dès la naissance; l'enfant n'a rien présenté d'anormal, bien qu'il soit resté constamment en contact avec père bacillifère (neuf mois).

12° Enfant A..., née le 2 octobre 1929. Vaccinée dès la naissance. L'enfant s'est bien développée et n'a fait aucune maladie, bien qu'elle soit en contact permanent depuis sa naissance avec père tuberculeux bacillifère (neuf mois).

13° Enfant G... (Doemetra), née le 13 juin 1928. Vaccinée dès la naissance et revaccinée à la fin de la première année. En contact permanent avec mère bacillifère. Allaitement artificiel dès les débuts ; a présenté des troubles de rachitisme qui ont été améliorés par l'ergostérol irradié. L'examen radioscopique des poumons, fait à la fin de la première année, n'a révélé aucune lésion. Actuellement, l'enfant est bien portant (deux ans).

14° Enfant M..., née le 10 octobre 1929. Vaccinée dès la naissance. En contact permanent avec père bacillifère. Se développe normalement. Une sœur, qui n'a pas été vaccinée, est décédée à l'âge de quatorze mois de méningite tuberculeuse (neuf mois).

15° Enfant Fl... (Jeanne), née en juillet 1927. Vaccinée dès la naissance et revaccinée à la fin de la deuxième année. A vécu en contact permanent avec père constamment bacillifère jusqu'à ces derniers temps où le père a été hospitalisé au sanatorium de Sotiria. A fait une broncho-pneumonie à la fin de la première année ; puis, à l'âge de deux ans, une adénite inguinale probablement de nature tuberculeuse. Un des ganglions a suppuré, mais s'est bientôt cicatrisé. L'enfant est actuellement en parfait état de santé (deux ans et onze mois).

16° Enfant Renieri, né en juillet 1929 de parents apparemment sains. Vacciné dès la naissance. A vécu en contact permanent avec une tante bacillifère. S'est développé normalement (onze mois).

#### DEUXIÈME GROUPE :

ENFANTS NÉS DANS UN MILIEU APPAREMMENT SAIN  
PUIS EXPOSÉS A UN CONTACT BACILLIFÈRE PROLONGÉ.

17° Enfant C... (Jean), né le 1<sup>er</sup> septembre 1926. Vacciné dès la naissance. L'enfant est né dans un milieu apparemment sain. Il a fait une angine, puis une bronchite à la fin de la première année. Le père, à la suite d'une atteinte de dengue, fut reconnu tuberculeux bacillifère au début de 1929. L'enfant est resté en contact avec lui pendant quinze mois. *Lors d'une visite de l'infirmière visiteuse, il a été trouvé buvant les crachats de son père avec un dé à coudre !* A été revacciné à la fin de sa troisième année. L'enfant est actuellement en parfait état de santé (trois ans et neuf mois).

18° Enfant C... (Nicolas), né le 11 novembre 1928 dans un milieu apparemment sain. Vacciné dès la naissance. Son père fut reconnu tuberculeux bacillifère en septembre 1929. L'enfant est resté pendant treize mois en contact avec son père qui présentait toujours des bacilles de Koch dans ses crachats. Actuellement bien portant (un an et sept mois).

19° Enfant D... (Hélène), née le 7 mars 1928 dans un milieu apparemment sain. Vaccinée dès la naissance et revaccinée à la fin de la première année. Cependant le grand-père, qui vivait dans la même maison, est mort de tuberculose pulmonaire en mars 1929. Le père de l'enfant fut reconnu tuberculeux bacillifère en 1928. L'enfant est resté pendant dix mois en contact avec son père qui est décédé en mai 1929 de tuberculose pulmonaire. N'a présenté aucune maladie et est actuellement très bien portant (deux ans et trois mois).

20° Enfant X... (Photini), née le 4 novembre 1925 dans un milieu apparemment sain. Vaccinée dès la naissance et revaccinée à la fin de la première année. Allaitement maternel pendant dix mois. La mère de l'enfant a présenté des lésions de tuberculose pulmonaire et laryngée au début de 1928, avec présence de bacilles dans les crachats. Elle est morte en août 1928, l'enfant ayant vécu pendant seize mois et jusqu'au dernier moment en contact avec elle. Actuellement très bien portant (quatre ans et huit mois).

21° Enfant Ath... (Stelio), né le 22 août 1926 de parents apparemment sains. Vacciné dès la naissance et revacciné à la fin de la troisième année. La mère fut reconnue tuberculeuse avec expectorations bacillifères en janvier 1929. Elle est morte en juillet 1929. Le père examiné à la fin de 1929 fut reconnu tuberculeux avec expectorations bacillifères. L'enfant, bien qu'il ait vécu en contact intime pendant douze mois avec sa mère, et qu'il continue à vivre actuellement avec son père bacillifère, est en parfait état de santé (trois ans et dix mois).

Ainsi, sur 15 enfants *nés en milieu contaminé*, 11 sont restés en contact permanent avec père tuberculeux constamment bacillifère pendant une période de cinq à vingt-six mois; 1 est resté en contact avec père et mère bacillifères pendant douze mois; 3 sont restés en contact avec mère bacillifère pendant



quatre à quarante-huit mois, et enfin 1 est resté en contact pendant dix mois avec une tante bacillaire.

Sur 5 enfants nés en milieu apparemment sain et qui ont été ensuite exposés à un contact bacillaire permanent, 2 ont vécu avec père bacillifère, l'un pendant quinze mois, l'autre pendant douze mois; le troisième est resté pendant dix mois en contact avec père et grand-père bacillaires; le quatrième, pendant seize mois avec mère bacillaire, et enfin le dernier pendant dix mois avec père et mère bacillaires.

Tous ces enfants, bien que restés en contact avec une source bacillaire abondante, n'ont présenté aucune lésion présumée tuberculeuse.

Chez l'un d'eux seulement on a observé une adénite inguinale suppurée dont la nature tuberculeuse n'a pas pu être démontrée par les examens de laboratoire. Cette adénite a d'ailleurs guéri complètement sans que ni l'examen clinique, ni l'examen radioscopique ait révélé chez cet enfant, actuellement bien portant, la moindre localisation tuberculeuse.

Ces faits démontrent que le BCG confère aux enfants une immunité évidente vis-à-vis des infections tuberculeuses les plus graves.

## SUR LA VACCINATION DU LAPIN ET DU COBAYE CONTRE LE TÉTANOS CÉRÉBRAL

par S. MUTERMILCH et M<sup>lle</sup> E. SALAMON.

E. Roux et A. Borrel (1) ont établi, il y a trente ans, que la toxine tétanique injectée chez le lapin et chez le cobaye en plein cerveau provoque une maladie caractérisée par des troubles particuliers (crises convulsives, excitation générale, troubles moteurs, polyurie, etc.) qui ne rappelle en rien le tétanos habituel; la mort des animaux survient plus ou moins vite, suivant la dose de toxine injectée.

Les mêmes auteurs ont signalé ce fait intéressant que les animaux, vaccinés activement ou passivement vis-à-vis de la toxine tétanique et qui résistent à des doses mortelles de la toxine injectée sous la peau ou dans les muscles, succombent, dans la majorité des cas, à des inoculations de la toxine pratiquées directement dans le cerveau.

Dans les expériences de Roux et Borrel, le lapin s'est montré plus sensible vis-à-vis des inoculations intracérébrales de la toxine tétanique que le cobaye. En effet, ce dernier, lorsqu'il est convenablement vacciné, résiste parfois à l'épreuve intracérébrale, tandis que la résistance cérébrale du lapin ne s'observe que dans des cas tout à fait exceptionnels.

Roux et Borrel résument leurs expériences comme suit : « *Quand on opère sur un certain nombre d'animaux, il en est toujours quelques-uns qui restent bien portants* » et ils en donnent une explication dont il sera question plus loin.

Au cours des recherches sur l'immunité méningée que nous poursuivons depuis quelques années et qui ont déjà fait l'objet de plusieurs communications à l'Académie des Sciences (2) et à la Société de Biologie (3), nous avons été

(1) Ces *Annales*, 12, 1898, p. 225.

(2) *C. R. de l'Acad. des Sc.*, 1927, p. 911, 26 décembre 1928, 14 janvier 1929.

(3) *C. R. de la Soc. de Biol.*, 16 octobre 1926, 12 février 1927.

amenés à aborder, entre autres, le problème de l'immunité névrauxique dans le tétanos.

Nous avons, en effet, établi précédemment que l'introduction des divers antigènes tels que : les hématies étrangères, les vaccins microbiens, le virus rabique, etc. directement dans la cavité méningée du lapin, déterminait la production locale des anticorps correspondants et l'apparition des hémolysines, des agglutinines et des substances rabcides dans le liquide céphalo-rachidien.

De même, l'introduction de l'anatoxine tétanique dans la cavité méningée du lapin engendrait la formation locale de l'antitoxine tétanique.

Pour démontrer la formation locale de l'antitoxine tétanique dans le liquide céphalo rachidien, nous avons opéré de la façon suivante : on se servait de l'anatoxine tétanique préparée à l'Institut Pasteur. On la diluait au quart avec de l'eau physiologique, à cause de l'intolérance que les lapins manifestaient vis-à-vis des inoculations rachidiennes de l'anatoxine non diluée et qui était due, sans doute, à l'action de la peptone, le bouillon peptoné seul ayant toujours provoqué les mêmes symptômes de choc que l'anatoxine.

On inoculait à un lot de lapins, dans la cavité méningée, et à un autre lot de lapins, dans la cavité péritonéale, 2 cent. cubes d'anatoxine tétanique diluée au quart. Ces inoculations furent répétées à quatre reprises différentes, à huit jours d'intervalle. Avant chaque réinoculation, on prélevait des échantillons de sang et de liquide céphalo-rachidien ; les sérums inactivés, les liquides incolores et limpides étaient mélangés, à parties égales, avec 10 doses mortelles de toxine et éprouvés, quant à leur pouvoir préventif, sur des souris. Afin d'économiser les souris, on travaillait, dans la majorité des cas, avec des mélanges des sérums et des liquides céphalo-rachidiens des lapins, traités tous d'une manière identique (tableaux I et II).

Il résulte de ces tableaux que *la vaccination des lapins par la voie péritonéale détermine l'apparition de l'antitoxine dans leurs sérums, tandis que leurs liquides céphalo-rachidiens se montrent dépourvus de toute action antitoxique. Par contre, la vaccination par la voie méningée conduit à la formation de l'anti-*

*toxine correspondante, aussi bien dans la circulation générale que dans le liquide céphalo-rachidien, et elle fait son apparition beaucoup plus rapidement que chez les animaux vaccinés par la voie péritonéale. De plus, le taux antitoxique des sérums des*

TABLEAU I. — L'inoculation de l'anatoxine dans la cavité péritonéale.

HUMEUR	DILUTION	ÉPREUVE huit jours après 1 <sup>re</sup> inoculation	HUIT JOURS après 2 <sup>e</sup> inoculation	HUIT JOURS après 3 <sup>e</sup> inoculation	HUIT JOURS après 4 <sup>e</sup> inoculation
Sérums . . . . .	Pur. 1/10 1/100	Tétanos. Tétanos. Tétanos.	Tétanos. Tétanos. Tétanos.	Survit. Survit. Tétanos.	Survit. Survit. Tétanos.
Liquide céphalo-rachidien	Pur. 1/10	Tétanos. Tétanos.	Tétanos. Tétanos.	Tétanos. Tétanos.	Tétanos. Tétanos.

TABLEAU II. — L'inoculation de l'anatoxine dans la cavité méningée.

HUMEUR	DILUTION	ÉPREUVE huit jours après 1 <sup>re</sup> inoculation	HUIT JOURS après 2 <sup>e</sup> inoculation	HUIT JOURS après 3 <sup>e</sup> inoculation	HUIT JOURS après 4 <sup>e</sup> inoculation
Sérums . . . . .	Pur. 1/10 1/100	Tétanos. Tétanos. Tétanos.	Survit. Tétanos. Tétanos.	Survit. Survit. Tétanos.	Survit. Survit. Tétanos partiel.
Liquide céphalo-rachidien	Pur. 1/10	Tétanos. Tétanos.	Tétanos. Tétanos.	Survit. Tétanos.	Survit. Tétanos local.

*animaux vaccinés par la voie méningée s'est montré supérieur à celui des animaux vaccinés par la voie péritonéale.*

En présence de ces résultats, nous nous sommes demandé comment allaient se comporter nos animaux vaccinés par les deux voies différentes vis-à-vis des inoculations intracérébrales de la toxine tétanique. Pour répondre à cette question, nous avons vacciné un lot de lapins par la voie méningée et un autre lot par la voie péritonéale (4 inoculations de 0 c. c. 5 d'anatoxine, à huit jours d'intervalle). Huit jours après la dernière injection de vaccin tétanique, on éprouvait les lapins avec des doses variées de toxine tétanique, inoculée dans le cerveau (tableau III).

Cette expérience, confirmée par d'autres, analogues, prouve



que, d'accord avec les résultats obtenus par Roux et Borrel, les lapins vaccinés par la voie péritonéale ne résistent pas à l'inoculation de la toxine tétanique dans l'encéphale; par contre, les ia-

TABLEAU III.

LAPIN	VACCINÉ par voie	DOSES DE TOXINE inoculées dans le cerveau	RÉSULTATS
50 . . . . .	Méningée.	0,5 au 1/50	Survit.
52 . . . . .	Méningée.	0,5 au 1/25	Survit.
47 . . . . .	Méningée.	0,5 au 1/10	Survit.
53 . . . . .	Méningée.	0,5 au 1/4	Légèrement malade se remet, meurt un mois après.
49 . . . . .	Méningée.	0,5 pure	Meurt de tétanos.
61 . . . . .	Péritonéale.	0,5 au 1/50	Meurt de tétanos.
62 . . . . .	Péritonéale.	0,5 au 1/25	Meurt de tétanos.

*pins vaccinés par la voie méningée peuvent recevoir impunément dans le cerveau plusieurs doses mortelles de la même toxine.*

Nous étions persuadés que le problème de la vaccination des animaux vis-à-vis du tétanos cérébral était ainsi résolu, et nous avons conclu que *la présence de l'antitoxine dans le liquide céphalo-rachidien était indispensable pour préserver ces animaux contre l'intoxication cérébrale*, et que le mécanisme de la résistance des animaux vaccinés par la voie méningée consistait en une simple neutralisation de la toxine injectée dans l'encéphale par l'antitoxine présente dans le liquide céphalo-rachidien.

Quelle ne fut donc pas notre surprise, lorsque nous avons pris connaissance des notes de Descombey, condensées ensuite dans le mémoire paru dans le n° 5 du tome 43 des *Annales de l'Institut Pasteur*, où cet auteur affirme avoir réussi à rendre les cobayes résistants à l'inoculation des doses mortelles de toxine tétanique dans le cerveau au moyen d'une simple vaccination pratiquée par la voie sous-cutanée.

Les recherches de Descombey ont porté exclusivement sur les cobayes. Il les traitait par une seule injection sous-cutanée de 0 c. c. 1 d'anatoxine tétanique et les éprouvait ensuite, quant à leur résistance névraïque, trente-cinq jours après, avec plusieurs doses mortelles de toxine. Le résultat de ces expériences fut le suivant : un certain nombre de cobayes suppor-

taient l'épreuve cérébrale sans aucun inconvénient, d'autres succombaient, d'autres, enfin, manifestaient des symptômes incontestables de tétanos, mais survivaient. Par exemple, sur 6 cobayes vaccinés par la voie cutanée, 3 n'ont pas manifesté de syndrome tétanique, 2 ont été malades, mais ont guéri, et le sixième est mort de tétanos cérébral.

Lorsqu'on compare les résultats des expériences de Descombey à ceux obtenus, trente ans auparavant, par Roux et Borrel, on s'aperçoit qu'ils ne diffèrent, au fond, les uns des autres que quantitativement, c'est-à-dire que le premier de ces auteurs obtient la résistance cérébrale chez un nombre plus grand d'animaux que Roux et Borrel, mais que, lui non plus, n'arrive pas à vacciner *régulièrement* le cobaye vis-à-vis du tétanos cérébral.

Toutes ces recherches peuvent donc être résumées comme suit :

1° Le cobaye, vacciné par la voie sous-cutanée, résiste souvent à l'inoculation de la toxine tétanique dans le cerveau (Roux et Borrel, Descombey).

2° Le lapin, vacciné par la voie sous-cutanée, résiste exceptionnellement à la même épreuve (Roux et Borrel, Mutermilch et Salamon).

3° Le lapin, vacciné par la voie méningée, se montre régulièrement réfractaire vis-à-vis du tétanos cérébral (Mutermilch et Salamon).

A quoi attribuer cette irrégularité de résultats obtenus? Pourquoi le cobaye se laisse-t-il vacciner plus facilement que le lapin contre le tétanos cérébral? Par quel mécanisme doit-on interpréter l'immunité cérébrale d'un certain nombre d'animaux vaccinés par une voie autre que la voie méningée? Autant de questions auxquelles tous ceux qui se sont intéressés au problème ont cherché la réponse. Les premiers, chronologiquement, Roux et Borrel, ont émis l'hypothèse que la résistance cérébrale de certains animaux pouvait être attribuée aux hémorragies locales se produisant fréquemment au cours de la trépanation et particulièrement chez le cobaye, dont l'encéphale est riche en vaisseaux sanguins. Textuellement, ils s'expriment comme suit : « l'expérience manque quelquefois avec les cobayes immunisés, parce que leur cerveau est plus vasculaire que celui du lapin », et, plus loin : « quand on opère sur un

certain nombre d'animaux, il en est toujours quelques-uns qui restent bien portants, car on ne peut constamment éviter un petit épanchement sanguin » et encore plus loin, au sujet de la sensibilité cérébrale des animaux immunisés : « l'antitoxine tétanique injectée aux animaux reste-t-elle dans le sang... elle n'arrive pas en contact du poison et les deux substances, pourtant si rapprochées, ne se rencontrent pas ».

Descombey se refuse d'accepter l'interprétation de Roux et Borrel. Il n'admet pas que des quantités insignifiantes de sang extravasé puissent suffire à neutraliser la toxine inoculée dans le cerveau, et pour prouver le bien-fondé de son raisonnement il a soumis des cobayes à des inoculations intracérébrales de mélanges de toxine tétanique avec du sang des cobayes vaccinés par la voie sous-cutanée et ayant résisté à l'épreuve cérébrale, les quantités de sang ayant été choisies de telle manière qu'elles dépassaient largement celles qui pourraient résulter de l'extravasation accidentelle. Or, les animaux ainsi traités succombaient régulièrement au tétanos cérébral. Il paraît donc que des hémorragies cérébrales, d'ordre de grandeur telle qu'on observe au cours de la trépanation, sont incapables d'expliquer la survie des animaux vaccinés.

Ayant ainsi réfuté l'hypothèse émise par Roux et Borrel, Descombey s'efforce de la remplacer par une autre, différente. Il prétend que la vaccination par la voie sous-cutanée détermine une immunité générale de l'animal, laquelle relève uniquement de la *présence de l'antitoxine dans les humeurs de l'organisme*. Il nie, et ceci avec raison, l'existence d'une immunité tétanique tissulaire. Mais son hypothèse s'arrête là ; il ne cherche pas à expliquer par quel mécanisme l'antitoxine présente dans les *humeurs* est capable de neutraliser la toxine inoculée dans le cerveau. De plus, l'expression « les humeurs de l'organisme » ne répond nullement aux faits observés.

Nous serions d'accord avec cet auteur s'il parlait d'une *immunité sanguine*, car le sang des animaux vaccinés par la voie sous-cutanée contient toujours des quantités appréciables d'antitoxine tétanique ; par contre, d'autres humeurs de l'organisme, telles que le liquide céphalo-rachidien, l'humeur aqueuse, etc. en sont totalement dépourvues : nos expériences sur le lapin nous ont suffisamment instruits à ce sujet. Le rai-

sonnement de Descombey présente donc ici une lacune, car il n'explique pas de quelle manière l'antitoxine sanguine arrive en contact avec la toxine injectée dans le cerveau.

Avant toute tentative de combler cette lacune, nous avons décidé de soumettre les expériences de Descombey à une vérification soignée, car il est tout de même frappant que cet auteur ait réussi à vacciner un très grand nombre d'animaux vis-à-vis de l'épreuve cérébrale au moyen d'inoculations sous-cutanées d'anatoxine. Nos recherches personnelles portent sur le cobaye et sur le lapin et, dans notre première série d'expériences, nous avons suivi exactement la technique de Descombey. A cet effet, on inoculait à un lot de cobayes, sous la peau de l'abdomen, 1 cent. cube d'anatoxine tétanique diluée au 1/10. On les éprouvait trente à trente-six jours après par la voie cérébrale, avec des doses variées de toxine tétanique.

EXPÉRIENCE I.

COBAYE	VACCINÉ ou non	DOSES MORTELLES de toxine tétanique injectées dans le cerveau	RÉSULTATS
74. . . . .	Oui.	1	Mort de tétanos le dixième jour.
75. . . . .	Oui.	2	Survit.
76. . . . .	Oui.	5	Survit.
77. . . . .	Oui.	10	Survit.
40. . . . .	Oui.	20	Survit.
<i>Témoins :</i>			
82. . . . .	Non.	1	Mort de tétanos.
83. . . . .	Non.	2	Mort de tétanos.
84. . . . .	Non.	5	Mort de tétanos.
85. . . . .	Non.	10	Mort de tétanos.
86. . . . .	Non.	20	Mort de tétanos.

EXPÉRIENCE II.

COBAYE	VACCINÉ ou non	DOSES MORTELLES de toxine tétanique injectées dans le cerveau	RÉSULTATS
60. . . . .	Oui.	2	Tétanos, mais survit.
61. . . . .	Oui.	10	Mort de tétanos.
62. . . . .	Oui.	50	Mort de tétanos.
<i>Témoins :</i>			
15. . . . .	Non.	2	Mort de tétanos.
16. . . . .	Non.	10	Mort de tétanos.
17. . . . .	Non.	50	Mort de tétanos.



## EXPÉRIENCE III.

COBAYE	VACCINÉ ou non	DOSES MORTELLES de toxine tétanique injectées dans le cerveau	RÉSULTATS
25 . . . . .	Oui.	20	Survit.
88 . . . . .	Oui.	50	Mort de tétanos.
<i>Témoins :</i>			
33 . . . . .	Non.	20	Mort de tétanos.
11 . . . . .	Non.	50	Mort de tétanos.

Les expériences de Descombey se trouvent ainsi confirmées :

*Un certain nombre de cobayes, immunisés par la voie sous-cutanée et éprouvés trente à trente-six jours après, résistent au tétanos cérébral.*

En nous adressant au lapin, nous avons obtenu des résultats différents. Nous avons traité ces animaux par une seule injection sous-cutanée de 1 cent. cube d'anatoxine tétanique non diluée et nous les avons éprouvés, trente à trente-six jours après, par l'inoculation des doses variées de toxine tétanique dans le cerveau : à quelques rares exceptions près, aucun de ces animaux n'a manifesté de résistance cérébrale; presque tous, ils succombaient dans des délais sensiblement les mêmes que les animaux de contrôle.

En soumettant les cobayes et les lapins à une immunisation passive, nous avons obtenu des résultats analogues à ceux constatés dans l'immunisation active. En effet, *inoculés par la voie sous-cutanée avec de fortes doses de sérum antitétanique, et éprouvés le lendemain au point de vue de leur résistance antitétanique cérébrale, les cobayes ont souvent survécu, tandis que les lapins succombaient presque toujours.*

Voici, à titre d'exemple, quelques expériences :

## EXPÉRIENCE I.

On injecte dans la cavité péritonéale de trois cobayes 5 cent. cubes de sérum antitétanique de l'Institut Pasteur. On les éprouve le lendemain ainsi que les témoins, avec des doses variées de toxine, inoculée dans le cerveau.

COBAYE	QUANTITÉ DE SÉRUM antitétanique injectée dans la cavité péritonéale en cent. cubes	DOSES MORTELLES de toxine tétanique injectées dans le cerveau	RÉSULTATS
61. . . . .	5	5	Survit.
62. . . . .	5	10	Survit.
64. . . . .	5	50	Mort de tétanos.
<i>Témoins :</i>			
65. . . . .		5	Mort de tétanos.
66. . . . .		10	Mort de tétanos.
67. . . . .		50	Mort de tétanos.

## EXPÉRIENCE II.

LAPIN	QUANTITÉ DE SÉRUM antitétanique injectée dans la cavité péritonéale en cent. cubes	DOSES MORTELLS de toxine tétanique injectées dans le cerveau	RÉSULTATS
78. . . . .	20	1	Mort de tétanos.
79. . . . .	20	4	Mort de tétanos.
80. . . . .	20	4	Mort de tétanos.
<i>Témoins :</i>			
81. . . . .		1	Mort de tétanos.
82. . . . .		4	Mort de tétanos.
83. . . . .		4	Mort de tétanos.

## EXPÉRIENCE III.

LAPIN	QUANTITÉ DE SÉRUM antitétanique injectée dans la cavité péritonéale en cent. cubes	DOSES MORTELLES de toxine tétanique injectées dans le cerveau	RÉSULTATS
4. . . . .	20	1	Survit.
5. . . . .	20	5	Mort de tétanos.
6. . . . .	20	20	Mort de tétanos.

EXPÉRIENCE III (*suite*).

LAPIN	QUANTITÉ DE SÉRUM antitétanique injectée dans la cavité péritonéale en cent. cubes	DOSES MORTELLES de toxine tétanique injectées dans le cerveau	RÉSULTATS
<i>Témoins :</i>			
7 . . . . .		1	Mort de tétanos.
8 . . . . .		5	Mort de tétanos.
9 . . . . .		20	Mort de tétanos.

Il résulte de ces expériences que la résistance névraxique antitétanique peut s'établir chez des cobayes vaccinés préalablement, activement ou passivement par la voie sous-cutanée ou intrapéritonéale tandis que, chez le lapin, elle ne s'obtient que fort difficilement et dans des cas tout à fait exceptionnels.

Pour arriver à coup sûr à une vaccination cérébrale du lapin, il est nécessaire de traiter cet animal par des *inoculations intraméningées* du vaccin tétanique, qui déterminent la production locale de l'antitoxine dans le liquide céphalo-rachidien. Nous avons ainsi été amenés à supposer que chaque fois qu'un animal supporte impunément une inoculation intracérébrale de plusieurs doses mortelles de toxine tétanique, son liquide céphalo-rachidien doit contenir des quantités suffisantes de l'antitoxine pour neutraliser la toxine injectée dans l'encéphale.

Chez les animaux vaccinés par des voies autres que la voie méningée, l'antitoxine ne peut pénétrer dans la cavité rachidienne qu'en venant de la circulation générale. Tout le problème de la résistance antitétanique névraxique se ramène ainsi à la seule question suivante : Par quel mécanisme l'antitoxine antitétanique pénètre-t-elle du sang dans le liquide chez des animaux vaccinés par la voie sous-cutanée ?

Nos études antérieures sur la perméabilité vasculo-méningée pour certains anticorps (1) [hémolysines, agglutinines] et pour les sels d'arsenic et de bismuth (2) nous ont déjà appris que, malgré un taux élevé de ces substances dans la circulation générale, elles ne pénètrent jamais, dans des conditions normales

(1) S. MUTERMILCH, *C. R. Soc. Biol.*, **95**, 1926, p. 945; *Id.*, **96**, 1927, p. 397.

(2) S. MUTERMILCH, M. DELAVILLE, J. BELIN, *C. R. Soc. Biol.*, **96**, 1927, p. 957; S. MUTERMILCH, E. SALAMON, *C. R. Soc. Biol.*, **98**, 1928, p. 4113.

de l'existence des animaux, dans le liquide céphalo-rachidien. Néanmoins, nous avons voulu nous assurer expérimentalement que l'antitoxine tétanique se comporte à ce point de vue de la même manière que les autres anticorps. Nous avons donc soumis un grand nombre de cobayes et de lapins à des inoculations sous-cutanées de fortes doses d'antitoxine tétanique et, le lendemain, nous avons pratiqué des ponctions cardiaques et occipitales; les sérums et les liquides ainsi recueillis furent mélangés avec des quantités variables de toxine tétanique et inoculés à des souris.

#### EXPÉRIENCE I.

Quatre cobayes reçoivent chacun 10 cent. cubes de sérum antitétanique dans la cavité péritonéale. Le lendemain, on pratique les ponctions cardiaques et les ponctions occipitales. On laisse coaguler les sangs et on recueille les sérums. On mélange, d'une part, tous les sérums, d'autre part, tous les liquides céphalo-rachidiens. Ce dernier mélange contient 0 c. c. 55 de liquide légèrement rosé. On prépare, en même temps, un liquide de contrôle composé d'eau physiologique additionnée d'une quantité de sang antitoxique de cobayes, suffisante pour lui donner une teinte rosée comparable à celle du mélange des liquides céphalo-rachidiens. On prépare ensuite diverses dilutions de ces trois échantillons (sang, liquide céphalo-rachidien et eau additionnée de sang) qu'on mélange avec deux doses mortelles de toxine tétanique et on les inocule aux souris. Le tableau ci-dessous montre des résultats :

DILUTION de sérum de cobayes mélangée avec deux doses de toxine tétanique et injectée aux souris	RÉSULTATS chez les souris	DILUTION de liquide céphalo-rachidien mélangée avec deux doses mortelles de toxine tétanique et injectée aux souris	RÉSULTATS chez les souris	DILUTION D'EAU + sang mélangé avec deux doses de toxine tétanique et injectée aux souris	RÉSULTATS chez les souris
cent. cubes		cent. cubes		cent. cubes	
0,4 pur . . . .	Survit.	0,4 pur	Survit.	0,4 pur	Survit.
0,4 au 1/10 . .	Survit.	0,4 au 1/10	Survit.	0,4 au 1/10	Survit.
0,4 au 1/100 . .	Survit.	0,4 au 1/20	Tétanos local prononcé.	0,4 au 1/20	Morte de tétanos.
0,4 au 1/1.000.	Survit.	0,4 au 1/50	Morte de tétanos.	0,4 au 1/50	Morte de tétanos.
0,4 au 1/10.000.	Tétanos partiel.	0,4 au 1/100	Morte de tétanos.	0,4 au 1/100	Morte de tétanos.
Témoin. . . . }	Morte de tétanos. }				

#### EXPÉRIENCE II.

Deux lapins reçoivent chacun 35 cent. cubes de sérum antitétanique dans la cavité péritonéale. On pratique le lendemain la ponction cardiaque et la



ponction occipitale. Les sérums et les liquides recueillis sont diversement dilués et mélangés avec deux doses mortelles de toxine tétanique. Ces mélanges sont inoculés aux souris.

	DILUTION DE SÉRUM mélangée avec deux doses mortelles de toxine tétanique	RÉSULTATS OBTENUS chez la souris	DILUTION de liquide céphalo-rachidien + deux doses mortelles de toxine tétanique	RÉSULTATS OBTENUS chez la souris
Lapin 49	cent. cubes 0,2 pur 0,2 au 1/10 0,2 au 1/100 0,2 au 1/1.000 0,2 au 1/10.000 0,2 au 1/10 0000	Survit. Survit. Survit. Survit. Tétanos local. Morte de tétanos.	cent. cubes 0,5 pur 0,5 au 1/10	Morte de tétanos. Morte de tétanos.
Lapin 50	0,2 pur 0,2 au 1/10 0,2 au 1/100 0,2 au 1/1.000 0,2 au 1/10.000 0,2 au 1/100.000	Survit. Survit. Survit. Survit. Tétanos local. Morte de tétanos.	0,5 pur 0,5 au 1/10	Morte de tétanos. Morte de tétanos.
Souris . .	Témoin.	Morte de tétanos.		

*Ces expériences montrent, avec toute évidence, que l'antitoxine tétanique est incapable de passer du sang dans le liquide céphalo-rachidien, même quand ce sang est très riche en antitoxine.*

Comment concilier ce fait avec la résistance cérébrale des animaux vaccinés par la voie sous-cutanée ? Une seule explication se présente alors à l'esprit : et, notamment que la barrière vasculo-méningée doit fléchir lors de l'inoculation d'épreuve pratiquée dans le cerveau et devenir perméable pour l'antitoxine sanguine.

Cette hypothèse nous a paru d'autant plus plausible que nos recherches antérieures sur l'immunité méningée avaient démontré que toute injection intraméningée d'eau physiologique, de bouillon, de lait, d'émulsions farineuses, etc. déterminait une méningite aseptique plus ou moins prononcée, se traduisant par une affluence leucocytaire et le passage des anticorps du sang dans le liquide céphalo-rachidien.

Or, lorsqu'on éprouve les animaux au point de vue de leur résistance névraxique antitétanique, on injecte dans leur cerveau du bouillon plus ou moins étendu d'eau servant de support à la toxine tétanique.

Cette opération n'engendre-t-elle pas une méningite, grâce à laquelle l'antitoxine tétanique pénètre du sang dans le liquide céphalo-rachidien ? Les expériences, dont la description suit, ont répondu affirmativement à cette question.

## EXPÉRIENCE I.

Douze cobayes reçoivent chacun, dans le cerveau, des quantités variables de bouillon dilué avec de l'eau physiologique. Le lendemain, on pratique les ponctions occipitales, on recueille une gouttelette de liquide céphalo-rachidien qu'on examine au microscope et on compte le nombre de leucocytes par champ microscopique. Les cobayes non traités par le bouillon servent de témoins.

COBAYES	BOUILLON AQUEUX injecté dans le cerveau	ASPECT DU LIQUIDE	QUANTITÉ de leucocytes par champ microscopique
49 . . . . .	0,2 au 1/10	Jaunâtre et trouble.	10-12
50 . . . . .	0,2 au 1/10	Légèrement trouble.	15-20
51 . . . . .	0,2 au 1/50	Rougeâtre.	10-12
52 . . . . .	0,2 au 1/100	Trouble.	35-45
81 . . . . .	0,2 au 1/10	Sanguinolent.	
82 . . . . .	0,2 au 1/10	Sanguinolent.	
83 . . . . .	0,2 au 1/10	Trouble.	10-17
84 . . . . .	0,2 au 1/10	Clair.	0-0-1
85 . . . . .	0,2 au 1/10	Sanguinolent.	
86 . . . . .	0,2 au 1/10	Trouble.	10-15
23 . . . . .	0,2 au 1/10	Limpide.	0
24 . . . . .	0,2 au 1/10	Limpide.	1-2-3
28 . . . . .	0,2 au 1/10	Limpide.	0-0-1-2
29 . . . . .	0,2 au 1/10	Rosé.	0-0-1
32 . . . . .	0,2 au 1/10	Rosé.	0-0-1
<i>Témoins :</i>			
53 . . . . .	Pas de bouillon dans les cerveaux.	Limpide.	0
54 . . . . .		Rougeâtre.	0
91 . . . . .		Limpide.	0
92 . . . . .		Limpide.	0
93 . . . . .		Rosé.	0
94 . . . . .		Rosé.	0
13 . . . . .		Limpide.	0
15 . . . . .		Rosé.	0
19 . . . . .		A peine rosé.	0
20 . . . . .		Limpide.	0

Cette expérience montre que l'inoculation intracérébrale du bouillon plus ou moins étendu d'eau physiologique s'accor-

pagne d'une diapédèse des globules blancs du sang dans le liquide céphalo-rachidien. L'intensité de l'affluence leucocytaire varie d'un cas à l'autre, de sorte que le liquide devient parfois très trouble et peut contenir jusqu'à 45 leucocytes par champ microscopique, tandis que dans d'autres cas la réaction méningée est à peine prononcée ou, exceptionnellement, nulle. Il va sans dire que les liquides céphalo-rachidiens des cobayes de contrôle ne contiennent que des leucocytes isolés.

Des résultats analogues furent obtenus chez des lapins inoculés dans le cerveau avec 0 c. c. 5 de bouillon dilué au 1/4, comme le montre le tableau ci-dessous :

EXPÉRIENCE II.

LAPIN	0 C. C. 5 DE BOUILLON dilué au 1/4 injecté dans le cerveau	ASPECT DU LIQUIDE	QUANTITÉ de leucocytes par champ microscopique
76. . . . .	Oui.	Légèrement trouble.	10 12
77. . . . .	Oui.	Légèrement trouble.	8-10
38. . . . .	Oui.	Clair.	1-2-3
39. . . . .	Oui.	Clair.	Très rares.
47. . . . .	Oui.	Légèrement trouble.	1-2 3
48. . . . .	Oui.	Clair.	Très rares.
37. . . . .	Non.	Clair.	0
40. . . . .	Non.	Clair.	0
49. . . . .	Non.	Clair.	0
50. . . . .	Non.	Clair.	0

Cette affluence leucocytaire provoquée par l'inoculation intracérébrale du bouillon s'accompagne-t-elle du passage de l'antitoxine sanguine dans le liquide céphalo-rachidien ? Pour répondre à cette question, nous avons soumis un certain nombre d'animaux à une inoculation intrapéritonéale du sérum antitétanique et à une injection simultanée du bouillon dans le cerveau. Le lendemain, on pratiquait des ponctions cardiaques et occipitales, on mélangeait des quantités variables de sérum et de liquide céphalo-rachidien avec plusieurs doses mortelles de toxine tétanique et on inoculait ces mélanges dans les pattes postérieures des souris.

Les résultats de cette série d'expériences ressortent nettement des deux tableaux suivants :

TABLEAU I.

COBAYE	QUANTITÉ de sérum antitétanique injectée dans le péritoine	QUANTITÉ de bouillon injectée dans le cerveau	DILUTION DE LIQUIDE mélangée avec deux doses mortelles de toxine tétanique et injectée aux souris	RÉSULTATS chez les souris
83	5 cent. cubes de sérum antitétanique dans le péritoine.	0 c.c. 2 de bouillon dilué au 1/10 dans le cerveau.	centimètres cubes 0,5 pur 0,5 au 1/2 0,5 au 1/20 0,5 au 1/100	Survit. Survit. Tétanos local. Morte de tétanos.
86			0,5 pur 0,5 au 1/2 0,5 au 1/20 0,5 au 1/100	Survit. Survit. Trace tétanos local. Morte de tétanos.
91, 92, 93, 94			0,5 pur (1) 0,5 au 1/2 0,5 au 1/20 0,5 au 1/100	Trace de tétanos. Morte de tétanos. Morte de tétanos. Morte de tétanos.
			(1) Ce liquide était obtenu par mélange des liquides de quatre cobayes.	

TABLEAU II.

LAPIN	10 CENT. CUBES DE SÉRUM antitétanique injectés dans le péritoine	0 C.C. 5 DE BOUILLON dilué au 1/4 et injecté dans le cerveau	DILUTION DE LIQUIDE mélangée avec deux doses mortelles de toxine tétanique et injectée aux souris	RÉSULTATS chez les souris
47	10 cent. cubes de sérum antitétanique dans le péritoine.	Oui.	centimètres cubes 0,5 pur 0,5 au 1/10 0,5 au 1/100	Survit. Survit. Morte de tétanos.
48		Oui.	0,5 pur 0,5 au 1/10 0,5 au 1/100	Morte de tétanos. Morte de tétanos. Morte de tétanos.
49		Non.	0,5 pur 0,5 au 1/10 0,5 au 1/100	Morte de tétanos. Morte de tétanos. Morte de tétanos.
50		Non.	0,5 pur 0,5 au 1/10 0,5 au 1/100	Morte de tétanos. Morte de tétanos. Morte de tétanos.

Il résulte de ces expériences que l'inoculation intracérébrale de quantités de bouillon aqueux sensiblement égales à celles qu'on injecte aux animaux lorsqu'on veut les éprouver au point de vue de leur résistance cérébrale antitétanique s'accompagne d'une réaction méningée se traduisant aussi bien par l'affluence leucocytaire que par le passage de l'antitoxine sanguine dans le liquide céphalo-rachidien. L'intensité de cette méningite aseptique diffère d'un cas à l'autre et dans certains cas très rares, elle est tout à fait insignifiante. Chez le cobaye, la réaction méningée se montre, en général, plus forte que chez le lapin. L'antitoxine tétanique pénètre donc dans la cavité rachidienne en quantités qui varient d'un cas à l'autre, suivant l'intensité de la réaction méningée, et ce fait est en accord parfait avec la résistance irrégulière des animaux vaccinés par la voie sous-cutanée vis-à-vis du tétanos cérébral. Le lapin se montre, à ce point de vue, plus sensible que le cobaye, car pour l'éprouver il est nécessaire de lui injecter des doses de toxine plus fortes qu'au cobaye et, d'autre part, la réaction méningée est, chez cet animal, moins accentuée que chez le cobaye.

La lacune que nous avons signalée dans la conception de Descombey se trouve ainsi comblée. Cet auteur affirme qu'il n'existe pas d'immunité antitétanique sans immunité humorale, et ceci est vrai, mais nous ajoutons à cette affirmation cette conception nouvelle que *le cerveau ne peut résister à l'intoxication tétanique que lorsque l'antitoxine tétanique est présente dans le liquide céphalo-rachidien. Chez des animaux vaccinés activement par la voie méningée cette antitoxine est toujours présente en fortes quantités dans le liquide céphalo-rachidien et les animaux ainsi traités résistent régulièrement au tétanos cérébral, tandis que, chez les animaux vaccinés par la voie sous-cutanée, l'antitoxine pénètre dans le liquide céphalo-rachidien grâce au fléchissement de la barrière vasculo-méningée provoqué par l'injection du bouillon dans l'encéphale; elle y pénètre en quantités, en général, peu prononcées et fort variables, d'où résulte l'irrégularité des résultats obtenus lors de l'épreuve cérébrale.*



## CONCLUSIONS.

1° La vaccination des animaux par la voie sous-cutanée ou intrapéritonéale avec l'anatoxine tétanique engendre la formation de l'antitoxine tétanique dans la circulation générale; les liquides céphalo-rachidiens des animaux ainsi traités ne contiennent jamais d'antitoxine.

2° La vaccination des animaux par la voie intraméningée engendre la formation de l'antitoxine aussi bien dans la circulation générale que dans le liquide céphalo-rachidien.

3° Les cobayes, vaccinés activement ou passivement par la voie sous-cutanée ou intrapéritonéale, résistent assez souvent à l'inoculation de la toxine tétanique dans le cerveau; par contre, les lapins se montrent, dans la majorité des cas, sensibles à cette inoculation.

4° Les animaux, vaccinés par la voie méningée, se montrent régulièrement réfractaires à l'inoculation de la toxine tétanique dans le cerveau.

5° La présence de l'antitoxine tétanique dans le liquide céphalo-rachidien est la condition *sine qua non* de la résistance névraxique antitétanique des animaux vaccinés. Chez les animaux vaccinés par la voie méningée, cette antitoxine est présente dans leurs liquides, grâce à une formation locale de cette substance, tandis que chez les vaccinés par la voie sous-cutanée ou intrapéritonéale, l'antitoxine pénètre passivement du sang dans le liquide, grâce au fléchissement de la perméabilité vasculo-méningée, provoqué par l'injection dans le cerveau du bouillon servant de support à la toxine tétanique.

(*Institut Pasteur.*)

## RECHERCHES SUR LA PRÉSENCE ET LA RÉPARTITION DU TITANE CHEZ LES ANIMAUX

par M. GABRIEL BERTRAND et M<sup>me</sup> VORONCA-SPIRT

Il est maintenant démontré que le titane, présent partout dans le sol, est absorbé par les plantes et se retrouve dans leurs diverses parties (1). Est-il retenu plus tard dans le corps des animaux et, dans ce cas, en quelles proportions le métal est-il fixé par les organes?

Un chimiste anglais, Rees, a publié, en 1835, qu'il avait reconnu du titane au chalumeau en examinant les cendres du sang et des capsules surrénales de l'homme (2), mais cette assertion a été contredite quelques années plus tard par Marchand (3). A son tour, Baskerville a fait connaître, en 1899, qu'il avait dosé par la méthode de Waller de petites quantités d'acide titanique dans quatre échantillons d'os et de chair provenant de l'homme et du bœuf (4); cependant ni Shoofs (5), ni Lehman (6) n'ont rien trouvé dans la suite, en appliquant la même méthode aux divers organes du cobaye et du chat.

Pour apporter une première contribution à la connaissance de cette question controversée et d'un grand intérêt biologique, nous avons réalisé une cinquantaine d'expériences sur des tissus séparés ou sur des corps entiers appartenant à une vingtaine d'espèces animales, en utilisant la technique qui nous a servi à étudier la présence et la répartition du titane chez les plantes (7).

C'est ainsi que nous avons analysé le foie, le cœur, les pou-

(1) *Ces Annales*, **44**, 1930, p. 185 et 270.

(2) *J. f. prakt. Chemie*, **5**, 1835, p. 134.

(3) *Ibid.*, **16**, 1839, p. 372.

(4) *Journ. amer. chem. Soc.*, **21**, 1899, p. 1099.

(5) *Bull. Ac. Méd. de Belgique*, 5<sup>e</sup> série, **2**, 1922, p. 473.

(6) *Chem. Zeit.*, **51**, 1927, p. 793.

(7) *Ces Annales*, **44**, 1930, p. 185.

mons, les reins, les muscles, parfois le cerveau, la moelle épinière, les poils, le sang du cheval, du veau, du mouton, du porc et du lapin; que nous avons examiné le foie du poulet, le corps entier de divers poissons, crustacés et mollusques. Les prises d'essai ont été uniformément de 100 grammes de matières fraîches. Le tube digestif des poissons a toujours été vidé de son contenu. Les crustacés et les mollusques ont été au préalable débarrassés de leur carapace ou de leur coquille.

D'après ces nouvelles expériences, le titane existe dans les animaux, mais en proportions assez nettement différentes, selon les organes et selon les espèces.

Dans le cheval, le veau, le mouton et le porc, le foie s'est montré constamment l'organe le plus riche en titane (de 0 milligr. 5 à 0 milligr. 6 par kilogramme frais); le cœur, les poumons et les reins ont accusé des teneurs à peu près égales les unes aux autres et voisines de la moitié de celles du foie; les muscles ne nous ont jamais donné, au contraire, assez de titane pour obtenir une réaction positive avec le peroxyde d'hydrogène. Il en a été de même avec le cerveau, la moelle épinière et le sang.

En opérant sur les organes du lapin, nous nous attendions à rencontrer des résultats analogues. Nous avons eu la surprise de constater que ces organes, y compris le foie, ne renfermaient pas assez de titane pour permettre d'en déceler la présence dans les conditions où nous étions placés.

Nous rappellerons que la quantité absolue de 0 milligr. 025, ou plutôt de 0 milligr. 03 de titane, était la plus petite que nous pouvions reconnaître. Comme nous opérions sur 100 grammes de tissus frais, cela équivalait à une proportion voisine de 0 milligr. 3 par kilogramme. C'est déjà la proportion très petite que nous avons rencontrée dans le cœur, les poumons et les reins des quatre premiers mammifères étudiés plus haut.

Par contre, les poils prélevés sur les peaux de deux lapins du laboratoire qui avaient été soigneusement lavées au savon, rincées et séchées, ont fourni la proportion relativement grande de 2 milligr. 2 de titane par kilogramme.

Le foie du poulet ne nous a pas donné de résultat positif, toujours en opérant sur 100 grammes. Nous n'avons pas

NOMS DES ANIMAUX et des organes examinés	TITANE en milligrammes par kilogramme		
	de matières fraîches	de matières sèches	de cendres
Cheval ( <i>Equus cab. L.</i> ) :			
Foie . . . . .	0,06	0,20	2,83
Cœur . . . . .	0,03	0,14	2,63
Poumon . . . . .	0,03	0,15	2,91
Rein . . . . .	0,03	0,17	2,19
Muscle, sang. . . . .	Ind. (1).	Ind.	Ind.
Veau ( <i>Bos taur. L.</i> ) :			
Foie . . . . .	0,06	0,20	3,00
Cœur . . . . .	0,03	0,14	2,37
Poumon . . . . .	0,03	0,13	1,81
Rein . . . . .	0,03	0,12	2,00
Muscle, cerveau, moelle . . . . .	Ind.	Ind.	Ind.
Mouton ( <i>Ovis ar. L.</i> ) :			
Foie . . . . .	0,06	0,20	3,33
Cœur . . . . .	0,03	0,13	2,60
Poumon . . . . .	0,03	0,14	1,67
Rein . . . . .	0,03	0,16	2,19
Muscle, cerveau . . . . .	Ind.	Ind.	Ind.
Porc ( <i>Sus scrof. L.</i> ) :			
Foie . . . . .	0,05	0,16	2,56
Cœur . . . . .	0,03	0,13	2,47
Poumon . . . . .	0,03	0,13	1,72
Rein . . . . .	0,03	0,16	2,30
Muscle, cerveau . . . . .	Ind.	Ind.	Ind.
Lapin ( <i>Lepus cunn. L.</i> ) :			
Foie, cœur, poumon, rein, muscle, cerveau.	Ind.	Ind.	Ind.
Poils . . . . .	0,21	0,22	13,9
Poulet ( <i>Gallus dom. L.</i> ) :			
Foie . . . . .	Ind.	Ind.	Ind.
Merlan ( <i>Merlangus vulg.</i> ) :			
Entier, tube digestif vidé. . . . .	0,09	0,40	3,53
Hareng ( <i>Clupea har.</i> ) :			
Entier, tube digestif vidé. . . . .	0,05	0,18	2,27
Maquereau ( <i>Scomber scomb.</i> ) :			
Entier, tube digestif vidé. . . . .	0,03	0,12	1,32
Carpe ( <i>Cyprinus carp.</i> ) :			
Entière, tube digestif vidé . . . . .	0,04	0,15	1,61
Eperlan ( <i>Osmerus eperl.</i> ) :			
Entier, tube digestif vidé. . . . .	0,03	0,13	1,35
Huitre portugaise ( <i>Gryphæa ang. Lam.</i> ) :			
Sans coquille. . . . .	0,30	2,14	13,17

(1) C'est-à-dire en trop petite quantité pour être dosable.

NOMS DES ANIMAUX et des organes examinés	TITANE en milligrammes par kilogramme		
	de matières fraîches	de matières sèches	de cendres
Coque ( <i>Cardium ed. L.</i> ) :			
Sans coquille. . . . .	0,30	2,05	11,08
Moule ( <i>Mytelus ed. L.</i> ) :			
Sans coquille. . . . .	0,60	2,73	32,18
Coquille Saint-Jacques ( <i>Pecten Jac. L.</i> ) :			
Sans coquille. . . . .	0,18	0,83	10,88
Escargot de Bourgogne ( <i>Helix pom. L.</i> ) :			
Sans coquille. . . . .	0,06	0,36	3,53
Petit-gris ( <i>Helix asp. L.</i> ) :			
Sans coquille. . . . .	0,06	0,46	3,44
Tourteau ( <i>Platycarc. pag. L.</i> ) :			
Sans carapace . . . . .	0,60	3,40	24,40
Langoustine ( <i>Nephr. norw. L.</i> ) :			
Muscles de la queue . . . . .	0,42	0,63	6,21
Organes céphalo-thoraciques. . . . .	3,24	17,43	67,31

examiné les plumes du même animal, craignant de ne pouvoir les débarrasser, à cause de leur contexture, des poussières minérales, peut-être titanifères, qui devaient les souiller.

Dans le corps de l'éperlan, du maquereau, de la carpe, du hareng et du merlan, nous avons trouvé des teneurs croissantes de 0 milligr. 3 à 0 milligr. 9 de titane par kilogramme de matières fraîches.

Les crustacés et les mollusques sont encore plus riches en titane que les poissons : dans le tourteau, l'ensemble des tissus mous renferme 6 milligrammes de métal par kilogramme frais; dans la langoustine, la masse musculaire de la queue, ou, plus exactement, de l'abdomen, en contient 1 milligr. 2 et les organes réunis de la tête et du thorax jusqu'à 32 milligr. 5; enfin, nous avons dosé dans l'escargot de Bourgogne et le petit-gris 0 milligr. 6, dans la coquille Saint-Jacques 1 milligr. 8, dans l'huître portugaise et la coque 3 milligrammes, dans la moule 6 milligrammes par kilogramme de matières fraîches retirées des coquilles. Les chiffres trouvés dans les cas du tourteau et des organes antérieurs de la langoustine sont



peut-être un peu forts, car il n'a pas été possible de procéder à un nettoyage parfait des tissus examinés; il en est peut-être aussi de même, mais à un degré moindre, dans le cas des mollusques marins; mais ces chiffres doivent être tenus comme valables pour les muscles de la langoustine, faciles à nettoyer, et pour les deux espèces d'escargots, extraites de leurs coquilles pendant le sommeil hivernal.

Il y a donc lieu d'admettre la présence du titane dans les animaux comme établie et de compter désormais ce métal dans la liste des éléments ordinaires de la matière vivante.

## RECHERCHES SUR LES GROUPES SANGUINS

par R. DUJARRIC DE LA RIVIÈRE et N. KOSSOVITCH

On savait depuis longtemps que le sérum d'un animal d'une espèce déterminée est capable d'agglutiner les globules rouges d'un animal d'une autre espèce (hétéro-agglutination). Des travaux relativement récents montrèrent que l'on peut observer aussi l'agglutination des globules rouges d'une espèce par le sérum de certains individus de cette même espèce. On a pu provoquer artificiellement ce phénomène. Ainsi Ehrlich et Morgenroth, injectant à des chèvres le sang d'autres chèvres, obtinrent parfois des hémolysines actives sur certains globules rouges homologues. On a pratiqué des recherches analogues sur le lapin (Ascoli, Schulz), le poulet (Hadda et Rosenthal), le bœuf (Todd), le chien (v. Dungern et Hirszfeld).

On constata bientôt que les hémolysines (iso-lysines) obtenues de cette manière ont une action très énergique sur les hématies de certains sujets, faible ou nulle sur d'autres, et que chaque sérum a une action particulière. Les hématies d'un même sujet peuvent être hémolysées par un sérum et ne pas l'être par un autre. Il existe donc, à ce point de vue, une différence entre les individus d'une même espèce; cette différence se traduit par l'existence dans le sang d'une propriété particulière qui peut être mise en évidence par une réaction à laquelle on a donné le nom d'*iso-réaction* par opposition à l'hétéro-réaction dont nous venons de parler.

Les premières observations d'iso-agglutination chez l'Homme datent de 1899-1900. En 1899, Shattock exposa à la « Pathological Society » de Londres le résultat de ses recherches qui établissaient que le sérum de certains malades est capable d'agglutiner les hématies d'individus sains. En 1900, Landsteiner fit la même observation et Grunbaum montra que le sérum des scarlatineux et des typhiques peut agglutiner les

hématies humaines. Jean Camus et Pagniez (1) reconnurent la même propriété au sérum de certains tuberculeux.

Le fait que les premières observations d'iso-agglutination furent faites chez des malades contribua à donner une mauvaise orientation aux recherches : on s'attacha surtout à établir un lien entre l'existence de cette réaction et un état pathologique.

C'est à Landsteiner que revient incontestablement le grand mérite d'avoir affirmé le premier que l'iso-agglutination est un phénomène *physiologique* et que le pouvoir iso-agglutinant existe régulièrement dans le sérum normal.

AGGLUTINOGENE ET AGGLUTININE. — Quelles sont les substances qui sont à la base du phénomène d'iso-agglutination? Une explication universellement adoptée est la suivante : les globules rouges agglutinables contiennent une substance appelée *agglutinogène* qui permet leur agglutination, et qui est contenue, comme nous le verrons, dans le stroma des hématies; le sérum sanguin contient une substance qui est liée à sa fraction euglobulinique et à laquelle on a donné le nom d'*agglutinine*. On a trouvé cette agglutinine non seulement dans le sérum sanguin, mais aussi dans le lait et le colostrum, dans le liquide céphalo-rachidien, dans les exsudats.

AGGLUTINATION. — Si on met au contact des globules rouges humains avec un sérum humain, c'est-à-dire l'agglutinogène avec l'agglutinine, on observe *parfois* l'agglutination. Nous disons qu'on observe ce phénomène parfois et non toujours. Il y a des cas où la fixation de l'agglutinine sur les hématies ne se produit pas. Landsteiner a montré, en effet, que les propriétés iso-agglutinantes normales ne sont pas identiques chez tous les individus, et qu'à ce point de vue ceux-ci peuvent être répartis en différents *groupes* (ou types).

CLASSIFICATION. — Landsteiner a d'abord réparti le sang

(1) *C. R. Soc. de Biologie*, 2 mars 1901, p. 242-244. C'est à tort qu'on ne cite jamais ce travail qui établissait pourtant, dès 1901, l'existence « d'un pouvoir agglutinant de certains sérums humains pour les globules rouges de l'homme » et le fait « qu'un malade peut avoir un sérum agglutinant et des globules complètement résistants à l'agglutination par d'autres sérums ».

humain en trois groupes auxquels il a attribué les chiffres 1, 2 et 3. Étudiant les réactions réciproques des hématies et des sérums de ces différents groupes, il a précisé qu'il existe :

1° Des individus dont les hématies ne sont pas agglutinables par les sérums des groupes 2 et 3, mais dont le sérum agglutine les hématies des groupes 2 et 3; 2° des individus dont les hématies sont agglutinées par les sérums 1 et 3, et dont le sérum agglutine les hématies 3; 3° des individus dont les hématies sont agglutinées par les sérums 1 et 2 et dont le sérum agglutine les hématies 2. Mais des élèves de Landsteiner, Decastello-Sturli, Hectoen, remarquèrent que le sérum de certains individus ne contient pas d'iso-agglutinines et interprétèrent ces cas comme des exceptions à la classification de Landsteiner.

Jansky, en 1907, et Moss, en 1910, montrèrent que les cas de Decastello-Sturli ne sont pas des exceptions, mais qu'ils dépendent de l'existence d'un quatrième groupe, dont la rareté avait jusqu'alors empêché l'observation. Le sérum de ce groupe ne contient pas d'iso-agglutinines, et par conséquent n'agglutine aucun sang, tandis que ses hématies sont agglutinées par les sérums de n'importe lequel des trois groupes. Ce groupe fut ajouté à la classification de Landsteiner.

On distingue donc actuellement quatre *groupes sanguins* dont les rapports peuvent être exprimés par le schéma suivant :

Jansky . . . . .	I	II	III	IV
Moss . . . . .	IV	II	III	I

Comme on le voit, les classifications de Moss et de Jansky diffèrent seulement par le mode de numération; ainsi le groupe I de Jansky correspond au IV de Moss et le groupe IV au groupe I. Cette similitude de numéros pour des groupes différents a donné lieu déjà à nombre d'erreurs et de malentendus.

En 1910, V. Dungern et Hirsfeld ont proposé une autre nomenclature qui est maintenant adoptée par la plupart des auteurs. Elle est basée sur les données suivantes : la réaction d'agglutination est une réaction d'immunité, qui a pour raison d'être la conservation de l'espèce (hétéro-agglutination), ou la conservation de la race (iso-agglutination). La propriété des hématies (agglutinogènes) doit être considérée comme anti-

gène, et la propriété des sérums (agglutinine) comme anticorps. V. Dungern et Hirszfeld supposent l'existence de deux propriétés agglutinantes (agglutinogènes) A et B. Ces propriétés sont des « gènes » indépendants et héréditaires. Les facteurs A et B peuvent se manifester dans les hématies, soit séparément (A. B.), soit ensemble (AB), ou faire défaut complètement (0) zéro, « non A », « non B ».

C'est-à-dire que l'on peut rencontrer chez l'Homme, suivant les individus, des globules rouges appartenant respectivement au groupe A, B, AB ou 0 [« non A », « non B »] (1).

Les propriétés A et B (agglutinogènes), en tant qu'antigène, déterminent dans les sérums des anticorps (agglutinines) correspondants. V. Dungern a démontré que, dans les sérums sanguins, ces anticorps agissent seulement contre le sang étranger (agglutinogène étranger). Un même sang ne possède pas d'anticorps contre ses propres hématies, c'est-à-dire que le sérum d'un individu quelconque n'agglutine pas ses globules rouges. Ces agglutinines ont été désignées par des lettres grecques,  $\alpha$  et  $\beta$ . Leur apparition simultanée dans le sérum est désignée par  $\alpha\beta$ , leur absence par  $o$  (« non  $\alpha$  », « non  $\beta$  »). Les combinaisons  $A\beta$ ,  $B\alpha$ ,  $ABo$  et  $0\alpha\beta$ , sont des combinaisons physiologiques normales; les autres :  $A\alpha$ ,  $B\beta$ ,  $AB\alpha\beta$  donnent agglutination; 0 étant, comme nous le savons, dépourvu d'agglutinogène.

Le tableau suivant montre la correspondance entre les trois classifications : Jansky, Moss et V. Dungern-Hirszfeld.

V. DUNGERN-HIRSZFELD	JANSKY	MOSS
—	—	—
$A\beta$ . . . . .	II	II
$B\alpha$ . . . . .	III	III
$ABo$ . . . . .	IV	I
$0\alpha\beta$ . . . . .	I	IV

(1) Nous avons fait adopter par la « Commission internationale pour l'étude des groupes sanguins » qui s'est tenue à Paris à l'Institut d'Anthropologie, le 15 juillet 1929, la résolution suivante :

« *Nomenclature.* — Il est indispensable d'adopter une nomenclature unique, la multiplicité des désignations actuelles étant une grande cause de confusion. La nomenclature A, B, AB, 0 (zéro) doit être adaptée à l'exclusion de toute autre; elle est simple, elle a le grand avantage de rappeler que les quatre groupes sont liés par les deux propriétés sanguines, que le groupe AB est caractérisé par la coexistence des propriétés A et B et le groupe 0 par l'absence de ces deux propriétés. »



THÉORIE DES QUATRE GROUPES. — D'après Landsteiner et Decastello-Sturli, v. Dungern et Hirszfeld, il existe donc deux agglutinogènes A et B et deux agglutinines  $\alpha$  et  $\beta$ . Le schéma suivant facilite la compréhension des quatre groupes, que, d'après ces données, on peut distinguer :

## AGGLUTINOGENE

A  
B  
A + B  
0

## AGGLUTININE

$\beta$   
 $\alpha$   
0  
 $\alpha + \beta$

Groupe  $0\alpha\beta$  (Jansky I, Moss IV). — Les globules rouges de ce groupe ne contiennent pas d'agglutinogènes (« non A »,

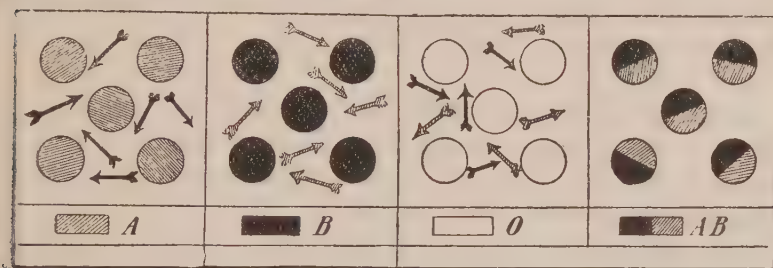


FIG. 1. — Loi de Landsteiner (Isoagglutination).  
Les rapports entre l'agglutinine et l'agglutinogène.

- I. Champ { Hématies grises — agglutinogène A }  
Sérum (flèche noire) — agglutinine  $\beta$  } Groupe  $A\beta$ .
- II. Champ { Hématies noires — agglutinogène  $\beta$  }  
Sérum (flèche grise) — agglutinine  $\alpha$  } Groupe  $B\alpha$ .
- III. Champ { Hématies blanches — sans agglutinogène 0 }  
Sérum (flèches noires et grises) — agglutinine  $\alpha\beta$  } Groupe  $0\alpha\beta$  (zéro).
- IV. Champ { Hématies noires et grises — agglutinogène AB }  
Sérum (flèches absentes) — sans agglutinine } Groupe  $AB_0$ .

« non B ») et par conséquent ne sont agglutinés par aucun sérum humain. Le sérum de ce groupe contient les deux agglutinines ( $\alpha$  et  $\beta$ ) et agglutine les hématies de tous les groupes (sauf les siennes).

Groupe  $A\beta$  (Jansky II, Moss II). — Les globules rouges de ce groupe, contenant la propriété A, peuvent être agglutinés par les sérums contenant l'agglutinogène  $\alpha$ , c'est-à-dire par le

sérum  $0\alpha\beta$  (Jansky I, Moss IV) et par celui du groupe B $\alpha$  (Jansky III et Moss). Le sérum de ce sang contient l'agglutinine  $\beta$  et, par conséquent, agglutine les hématies avec l'agglutinogène B, c'est-à-dire les hématies du groupe B $\alpha$  (Moss III et Jansky III) et ABo (Jansky IV, Moss I).

Groupe B $\alpha$  (Jansky III, Moss III). — Les globules rouges de ce groupe contiennent la propriété B, le sérum  $\alpha$ . Par conséquent, les hématies sont agglutinées par les sérums possédant l'agglutinine  $\beta$ , c'est-à-dire par le sérum du groupe  $0\alpha\beta$ , et A $\beta$ , et le sérum agglutine les globules rouges du groupe A $\beta$ .

Groupe ABo (Jansky IV, Moss I). — Les globules ont les deux propriétés A et B, et par conséquent sont agglutinés par les sérums de tous les autres groupes,  $0\alpha\beta$ , A $\beta$ , B $\alpha$ . Les sérums de ce groupe ne contiennent pas d'agglutinines, et n'agglutinent les globules rouges d'aucun groupe.

**DÉVELOPPEMENT ET CONSTANCE DES GROUPES.** — Les expérimentateurs ayant à étudier le sang d'individus de différents âges et de conditions très diverses, il est indispensable de préciser d'abord deux points très importants :

1<sup>o</sup> A quel moment de la vie apparaissent dans le sang les propriétés dont nous venons de parler? Les recherches d'un grand nombre de biologistes ont établi que l'agglutinogène apparaît dans les globules rouges chez le fœtus vers le quatrième ou cinquième mois de la vie intra-utérine.

Quant aux agglutinines, elles apparaissent plus tard dans le sérum. On ne les décèle qu'à partir de la vie extra-utérine et en quantité très faible. Elles augmentent progressivement après la naissance jusqu'à un taux définitif et fixe.

2<sup>o</sup> Le groupe auquel appartient un individu est-il fixe ou peut-il être modifié par des circonstances quelconques? Les recherches d'un grand nombre d'auteurs ont montré que le fait d'appartenir à un groupe sanguin est un caractère constant pour chaque être humain pendant toute la durée de sa vie. Un même sujet conserve le même groupe depuis sa naissance jusqu'à sa mort. Ni les conditions d'alimentation ou d'existence, ni l'âge, ni l'état de santé, ni les maladies ne le font varier. Il constitue un caractère individuel permanent et immuable. Nombre de chercheurs avaient observé cette

constance du groupe. Ainsi H. et L. Hirszfeld l'ont constaté après huit ans; Decastello après vingt et un ans; l'un de nous (Dr Kossovitch) vérifie la constance de son groupe depuis seize ans; Lattes, ayant étudié dans les quinze dernières années un grand nombre de personnes, n'a jamais observé une variation du groupe.

L'étude des groupes sanguins soulève encore un certain nombre d'autres questions (existence des sous-groupes, préparation et titrage des sérums agglutinants, formation des anticorps, etc.); nous ne pouvons les étudier ici (1), car nous désirons nous limiter à l'exposé des notions qui sont strictement indispensables pour la compréhension des recherches que nous avons poursuivies.

### Technique.

DÉTERMINATION DES GROUPES SANGUINS. — La réaction d'iso-agglutination se fait en mélangeant un sérum agglutinant avec des hématies et en observant l'agglutination. Pratiquement, la détermination des groupes sanguins est des plus simples, et nous avons utilisé deux méthodes (2) qui ont actuellement fait leurs preuves : celle de Beth-Vincent et celle de Dungern-Hirszfeld. Ces deux méthodes sont macroscopiques et les résultats peuvent être lus à l'œil nu. Dans la première on mélange, en proportions déterminées, du sérum et des hématies sur une même lame; on place d'un côté (marqué  $\beta$ ) une goutte de sérum agglutinant  $\beta$  (sérum du sang du groupe A) et de l'autre (marqué  $\alpha$ ) une goutte de sérum agglutinant  $\alpha$  (sérum du sang du groupe B). Une goutte de sang à l'étude, prélevée par piqûre au doigt, est mise avec un petit agitateur dans la goutte de sérum  $\beta$ ; une autre goutte est mise de même dans le sérum  $\alpha$ .

Au bout de deux à trois minutes, on constate, lorsqu'il

(1) Consulter à ce sujet les excellentes monographies parues dans ces derniers temps : 1° HIRZSFELD, *Konstitutionsserologie und Blutgruppenforschung*, Berlin, 1928; 2° LEONE LATTES, *L'individualité du sang*, Masson, Paris, 1929; 3° ROUBACHKINE, *Les groupes sanguins* (en russe).

(2) La technique microscopique de L. LATTES est plus spécialement employée pour les recherches médico-légales.

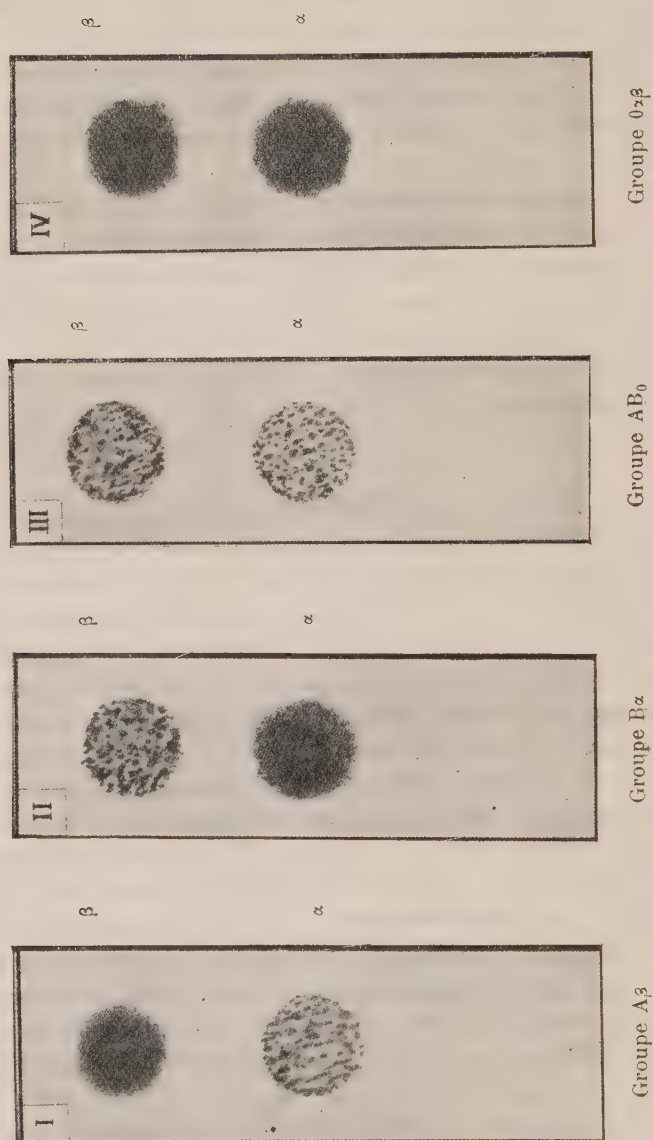


FIG. 2. — Réaction d'iso-agglutination.

n'y a pas d'agglutination, que le mélange reste homogène; s'il y a agglutination, les globules rouges se mettent en amas.

Les résultats se lisent de la façon suivante :

a) Si les hématies sont agglutinées par :

Le sérum  $\beta$ , le sang appartient au groupe B ;

Le sérum  $\alpha$ , le sang appartient au groupe A ;

Les sérums  $\alpha$  et  $\beta$ , le sang appartient au groupe AB.

b) Si les hématies ne sont pas agglutinées ni par le sérum  $\alpha$ , ni par le sérum  $\beta$ , le sang appartient au groupe 0 (« non A », « non B »).

La méthode de Dungern-Hirszfeld est basée sur le même principe, mais l'agglutination se fait dans des tubes. On recueille quelques gouttes (4 à 5) de sang dans chacun des deux tubes à essais où se trouve déjà 0 c. c. 5 à 1 cent. cube d'un mélange à 1/9 d'une solution à 2 p. 100 de citrate de soude (liquide anti-coagulant) et d'eau physiologique (0 c. c. 85 p. 100). On met dans un tube quelques gouttes de sérum  $\beta$ , dans l'autre le sérum  $\alpha$ . On mélange bien et on laisse les tubes pendant quelques heures à la température ordinaire. Après ce laps de temps, on lit les résultats de la même manière que pour la méthode précédente.

Le tableau ci-dessous indique les réactions possibles des quatre différents sérums, en présence des globules rouges de différents individus :

HÉMATIES	SÉRUM				OBSERVATIONS
	$\alpha\beta$	$\beta$	$\alpha$	0	
—	—	—	—	—	—
0. . . . .	—	—	—	—	+ agglutination.
A . . . . .	+	—	+	—	
B . . . . .	+	+	—	—	— pas d'agglutination.
AB. . . . .	+	+	+	—	

On voit que, pour déterminer le groupe d'un individu, il suffit d'avoir des sérums  $\alpha$  et  $\beta$ . Ces sérums agglutinants sont maintenant dans le commerce.

Le Comité d'Hygiène de la Société des Nations procède actuellement à des échanges de sérums entre les différents Instituts de recherches. Le pouvoir agglutinant de ces sérums est étudié comparativement. Il est très variable suivant les origines, comme l'indiquent les résultats des titrages que nous avons effectués (7 décembre 1929) :



SÉRUMS	Type A.	TAUX AGGLUTINANT
—		—
305.		128
306.		256
307.		256
308.		64
309.		64
310.		256
311.		64
312.		32
313.		128
314.		256

SÉRUMS	Type B.	TAUX AGGLUTINANT
—		—
228.		64
229.		256
230.		128
231.		128
232.		64
233.		128
234.		128
235.		256
236.		256
237.		128

Quand on ne possède pas à sa disposition des sérums étalonnés pour l'étude des groupes sanguins, on peut en préparer de la façon suivante : on prend du sang à une dizaine de personnes; on divise le sang recueilli en deux parties, de façon à avoir, pour un même sang, d'une part du sérum, et d'autre part des globules défibrinés. On fait alors réagir chaque sérum sur les globules des divers sangs. On note où se produit l'agglutination. On peut ainsi « grouper » les sangs et avoir à sa disposition des sérums dont on connaît les propriétés agglutinantes.

Supposons que nous ayons examiné le sang de dix personnes et que les résultats de cet examen soient ceux que nous indiquons dans le tableau I ci-contre.

Examinons le cas des sérums I, V et IX et des globules rouges correspondants 1, 5 et 9. Nous voyons que :

a) Les globules rouges 1, 5 et 9 ne sont agglutinés par aucun sérum ;

b) Les sérums I, V et IX agglutinent les globules rouges et tous les sangs (sauf les leurs);

Ces sangs appartiennent donc au groupe  $O\alpha\beta$  dont, comme nous le savons, les globules ne sont agglutinés par aucun

TABLEAU I.

		SÉRUMS										FORMULE des globules rouges	FORMULE du sang
		I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X		
Globules rouges.	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0	$O\alpha\beta$
	2	+	—	—	+	+	—	—	+	+	—	A	$A\beta$
	3	+	—	—	—	+	—	—	+	+	—	A	$A\beta$
	4	+	+	+	—	+	+	+	+	+	—	B	$B\alpha$
	5	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0	$O\alpha\beta$
	6	+	—	—	+	+	—	—	+	+	—	A	$A\beta$
	7	+	—	—	+	+	—	—	+	+	—	A	$A\beta$
	8	+	+	+	—	+	+	—	—	—	—	B	$B\alpha$
	9	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0	$O\alpha\beta$
	10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	AB	AB0
Formule des sérums.		$\alpha\beta$	$\beta$	$\beta$	$\alpha$	$\alpha\beta$	$\beta$	$\beta$	$\alpha$	$\alpha\beta$	0		

—, agglutination négative; +, agglutination positive. Les sérums sont marqués en chiffres romains. Les globules rouges correspondants en chiffres arabes.

sérum et dont le sérum agglutine les globules des autres groupes.

Considérons maintenant le sérum X et les globules 10 (même sang). Nous constatons que :

a) Les globules rouges sont agglutinés par tous les sérums (sauf par le sérum du même sang);

b) Le sérum n'agglutine les globules rouges d'aucun groupe. Ce sang appartient donc au groupe AB.

Les sérums II, III, VI, VII agglutinent les globules 4, 8.

Les sérums IV, VIII agglutinent les globules 2, 3, 6, 7.

On voit qu'il y a entre ces deux derniers groupes agglutination réciproque.

Les sangs 2 (II), 3 (III), 6 (VI), 7 (VII) appartiennent au groupe A.

Les sangs 4 (IV), 8 (VIII) appartiennent au groupe B.

Les résultats des recherches sur les groupes sanguins n'ont de valeur que s'ils portent sur un nombre élevé de sangs. Le

transport du matériel nécessaire était souvent difficile. Nous avons fait construire par M. Jouan une boîte (fig. 3) qui permet de porter commodément 200 petits tubes à hémolyse, des flacons pour liquide isotonique, alcool, iode, coton, tubes à aiguilles ou lancettes stériles, pipette, agitateurs, etc. Les

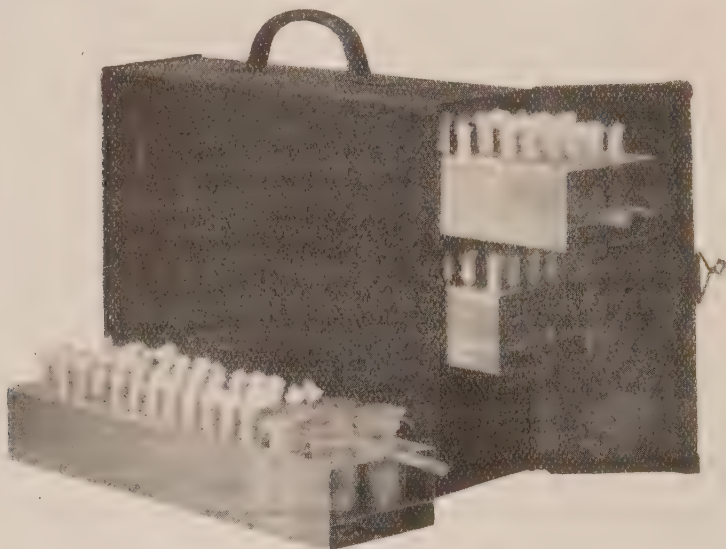


FIG. 3. — Boîte à prélèvements.

tiroirs retirés de la boîte servent de portoirs. Le tout est métallique, facilement stérilisable.

\*  
\* \*

D'abord simple curiosité scientifique, l'étude des groupes sanguins a pris une importance pratique considérable, lorsqu'une technique simplifiée ayant fait entrer la transfusion sanguine dans la pratique médicale courante, on s'est aperçu que l'examen préalable du sang du donneur pouvait éviter à l'opéré des accidents parfois très graves.

Mais cette étude n'a pas servi seulement à améliorer la technique des transfusions; elle a déjà permis aux anthropologistes d'importantes recherches sur les races humaines; elle commence à pénétrer en médecine et en médecine légale; elle cons-

titue une question si importante de Sérologie qu'il est actuellement bien peu d'Instituts de Bactériologie ou de Sérologie où elle ne soit l'objet de recherches. Les nôtres ont porté sur plusieurs points que nous envisagerons successivement : études anthropologiques, étude des groupes sanguins dans divers états pathologiques chez l'homme, détermination des groupes chez les animaux, recherches sur la nature même du phénomène d'agglutination, sur l'origine de l'agglutinogène, sur l'adsorption par les hématies, etc.

### Études anthropologiques.

C'est à L. et H. Hirszfeld que revient le mérite d'avoir découvert les relations qui existent entre la répartition des groupes sanguins et les caractères ethno-anthropologiques. Quand ces auteurs, profitant de la réunion au front de Salonique des troupes alliées, des prisonniers et de la population civile des Balkans, les examinèrent au point de vue des groupes, ce qui les frappa le plus fut la constance des quatre groupes décrits par Landsteiner. Ils se retrouvaient chez tous ces peuples; la proportion seule variait.

Depuis ces premières recherches de L. et H. Hirszfeld on a publié des milliers de travaux sur la question. On peut actuellement se baser sur les résultats de quelques centaines de milliers d'examens pratiqués chez les différents peuples du monde. Pour les résumer nous dirons que le groupe A  $\beta$  prédomine parmi les peuples de l'Europe centrale et septentrionale (40 p. 100), que ce pourcentage diminue pour les peuples de l'est et du sud-est de l'Europe, et que l'on constate le contraire pour le groupe B $\alpha$ . Ce groupe prend plus d'importance au fur et à mesure que l'on se rapproche de l'est et du sud-est de l'Asie et de l'Afrique. La différence de quantité pour A et B ne dépend, du reste, que de la situation géographique et leur proportion est spécifique pour chaque race.

Cette différence dans la répartition des groupes a incité les auteurs à chercher une formule permettant de caractériser une race. L. et H. Hirszfeld en ont élaboré une qu'ils ont nommée « Indice biochimique des races » :

TABLEAU II.

POPULATION	A	B	AB	0	I	AUTEURS
Anglais . . .	43,4	7,2	3,0	46,4	4,5	H. et L. Hirszfelf.
Français . . .	42,6	11,2	3,0	43,2	3,2	H. et L. Hirszfelf.
Italiens . . .	42,4	11,9	7,8	37,9	2,6	Mino.
Allemands . . .	47,3	11,3	5,7	36,0	3,1	V. Dungern et Hirszfelf.
Autrichiens . . .	40,0	10,0	8,0	42,0	2,7	Landsteiner.
Allemands-Autr. . .	37,4	17,4	2,6	42,6	2,0	Decastello Sturli.
Américains (Nord) . . .	40,0	7,0	10,0	43,0	2,9	Moss.
Tchèques . . .	40,0	12,4	7,8	39,2	2,4	Kossovitch.
Bulgares . . .	40,0	14,2	6,2	39,0	2,3	H. et L. Hirszfelf.
Serbes . . .	41,6	15,6	4,6	38,0	2,3	H. et L. Hirszfelf.
Greco . . .	41,8	16,2	4,0	38,2	2,25	H. et L. Hirszfelf.
Danois . . .	36,7	12,0	4,0	47,2	2,5	Johannsen.
Scandinaves . . .	48,6	13,7	4,3	33,4	2,9	Buchanan et Higley.
Ecosais . . .	33,9	16,8	5,7	43,6	1,8	Alexander.
Polonais . . .	37,5	20,8	9,1	32,5	1,2	Halber et Mydlarsky.
Russes . . .	31,2	21,8	6,3	40,7	1,3	H. et L. Hirszfelf.
Juifs (Polonais) . . .	42,4	17,4	8,1	33,1	1,9	Halber et Mydlarsky.
Juifs (Espagnols) . . .	33,0	23,2	5,0	38,8	1,3	H. et L. Hirszfelf.
Hongrois . . .	38,0	18,8	12,2	31,0	1,6	Verzar et Weszecky.
Roumains . . .	41,16	19,01	6,33	33,49	1,8	Popoviciu.
Norvégiens . . .	49,4	10,3	4,3	36,0	3,0	Jervell.
Slovaques . . .	31,3	15,8	8,2	44,7	1,6	Manuila.
Petits-Russes . . .	39,2	22,5	20,3	18,0	1,1	Manuila.
Japonais . . .	40,5	16,0	20,0	54,0	1,7	Hara et Kabayasky.
Australiens . . .	36,9	8,5	2,0	22,6	3,7	Felbut.
Suédois . . .	46,9	9,7	6,4	36,9	3,3	Hesser.
Chinois (Sud) . . .	38,8	19,4	9,8	31,8	1,6	Li Chi Pan.
Islandais . . .	32,1	9,6	2,6	55,6	2,0	Johannsen.
Wales . . .	38,54	4,17	1,04	56,25	7,5	Felbut.
Quensland . . .	38,22	5,76	1,05	54,97	5,8	Felbut.
Turcs . . .	38,0	18,6	6,6	36,8	1,7	H. et L. Hirszfelf.
Arabes . . .	32,4	19,0	5,0	43,5	1,5	H. et L. Hirszfelf.
Malgaches . . .	26,2	23,7	4,5	45,5	1,4	H. et L. Hirszfelf.
Sénégalais . . .	22,4	29,2	5,0	43,2	0,8	H. et L. Hirszfelf.
Annamites . . .	22,4	28,4	7,2	42,0	0,8	H. et L. Hirszfelf.
Hindous . . .	19,0	41,4	8,5	31,3	0,55	H. et L. Hirszfelf.
Tziganes . . .	21,1	38,9	5,8	34,2	0,6	Verzar et Weszecky.
Chinois . . .	24,0	34,0	10,0	32,0	0,8	Cabrera Wade.
Philippines . . .	14,7	19,6	1,0	64,7	0,76	Cabrera Wade.
Chinois (Nord) . . .	37,8	24,4	6,6	31,1	0,77	Fucamachi.
Coréens . . .	32,8	26,4	12,7	28,1	1,1	Fucamachi.
Mandchous . . .	26,63	38,2	8,5	26,6	0,75	Fucamachi.
Indiens (Amérique) . . .	20,2	2,1	»	77,7	9,6	Coca et Deibert.
Africains (Sud) . . .	27,2	19,2	1,6	52,0	1,3	Harvey-Pirie.
Kiangsou (Nord) . . .	29,7	26,4	4,9	39,0	1,1	Liang Backiang.
Setskuan (Sud) . . .	28,9	23,7	2,6	44,8	1,1	Liang Backiang.
Mélanésiens . . .	26,8	16,3	3,2	53,7	1,4	Heydon et Morphy.
Java . . .	25,7	29,0	5,4	39,9	0,9	Bais et Verhoef.
Sumatra . . .	23,0	28,0	6,5	42,5	1,2	Bais et Verhoef.
Nègres (Amérique) . . .	26,9	18,5	5,5	49,0	0,9	Lewis et Henderson.
Finlande . . .	43,0	17,3	5,8	33,9	2,1	Stren Ow.
Indigènes du haut Katanga . . .	22,0	24,0	9,0	45,0	0,93	Bruynoghe et Walravens.
Arméniens . . .	40,3	16,6	6,8	36,3	2,01	Kossovitch.
Finois . . .	30,7	18,8	7,0	43,5	1,9	Streng Ow.
Tatar de Crimée . . .	43,3	25,3	10,7	20,7	1,5	Besedine.
Hollandais . . .	41,7	8,6	3,0	46,8	3,8	Van Herwerden.
Etats-Unis . . .	36,0	14,2	5,1	44,4	3,9	Culpepper-Ableson.
Belges . . .	41,8	7,1	3,2	47,9	4,4	Staquet.
Islandais . . .	32,1	9,6	2,6	55,7	2,8	Jonsson.
Esquimaux . . .	12,9	2,4	4,0	80,6	2,4	Heinbecker et Pauli.
Indiens ours . . .	7,7	1,3	»	91,3	»	Snyder.
Indigènes de l'Afrique Equat. Française . . .	27,0	26,0	6,0	41,0	1,03	Liodt et Pojarski.



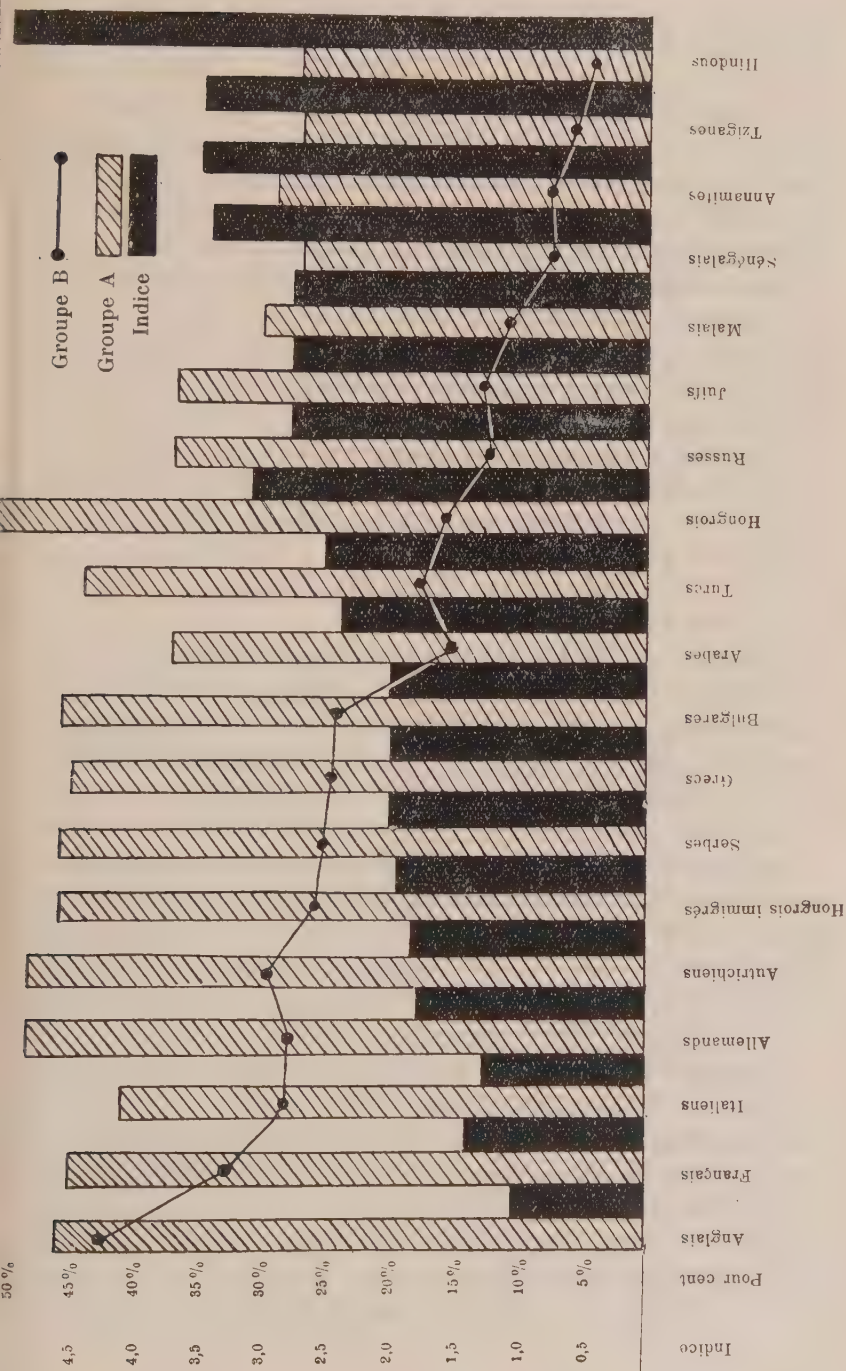


FIG. 4. — Iso-agglutination chez les peuples. Indice biochimique (d'après v. Bézna, reproduit de B. Breitner, *Die Bluttransfusion*).

$\frac{(A + AB)}{(B + AB)} =$  Indice, c'est-à-dire le rapport entre tous les A et tous les B.

La méthode comparative ayant une grande valeur en Anthropologie, nous croyons utile pour donner leur signification aux chiffres que nous avons trouvés dans un certain nombre de cas particuliers sur lesquels ont porté nos recherches de donner un tableau général indiquant la valeur de l'indice d'Hirszfeld chez différents peuples qui ont déjà été examinés à ce point de vue.

Comme on voit (tableau II et fig. 4), on trouve en Europe occidentale, en général, 40 à 45 p. 100 de A; ce pourcentage diminue en Europe orientale et sud-orientale et considérablement en Afrique et en Asie.

Le groupe B suit un ordre inverse. Il est relativement rare en Europe occidentale : 10 à 15 p. 100, tandis que, chez les populations orientales et sud-orientales européennes, le pourcentage est plus élevé : entre 20 et 30 p. 100. Plus loin, en Afrique et en Asie, ce groupe augmente nettement jusqu'à 44,2 p. 100 chez les Hindous.

Quant au groupe 0 (zéro), sa fréquence paraît subir peu d'oscillations chez les populations européennes et africaines, où elle est en général entre 35 et 45 p. 100. Chez les peuples asiatiques (Chinois, Japonais, Coréens, Mandchous, et aussi chez les Hongrois et les Tziganes, issus d'Asie), ces chiffres s'abaissent entre 20 et 35 p. 100 environ.

Au contraire, chez les peuples d'origine ancienne mais où les mélanges ont été très limités grâce à des circonstances spéciales comme par exemple chez les Indiens américains, les Esquimaux, les Lapons, les Islandais, les Malais des Philippines, on trouve une proportion très élevée du groupe 0 (qui peut dépasser 90 p. 100).

Il est probable que chez certains de ces peuples la constitution primitive et caractéristique est celle du groupe 0. Ainsi Snyder, Nigg ont constaté, chez les Indiens rouges, que la proportion chez les purs est très élevée, 91,3 p. 100, tandis que chez les sangs-mêlés elle s'approche de celle de la race blanche. La même constatation a été faite par Heinbecker et Pauli chez les Esquimaux.

Quant à l'indice biochimique d'Hirszfeld, on voit qu'il est

compris entre 2, 5 et 4 environ pour les peuples européens, entre 1 et 2 pour les intermédiaires, au-dessous de 1 pour les peuples de l'Asie et de l'Afrique.

Ces chiffres montrent d'une façon très éloquente pour tous les peuples un mélange extrême des trois caractères A, B et O. Ceci est surtout vrai pour l'Europe, ce qui confirme les recherches faites par les anthropologistes à l'aide d'autres données et qui montrent qu'en Europe il n'existe pas de races pures, mais des populations mixtes, résultats de l'interpénétration consécutive aux migrations, aux guerres, aux invasions; que c'est surtout la proportion relative des éléments constitutants d'une population qui varie, et non ces éléments eux-mêmes.

La distribution différente des groupes et la fréquence relative des caractères héréditaires permettent d'entrevoir plus exactement l'origine, les mélanges et les superpositions ethniques des populations actuelles.

#### HYPOTHÈSES DE L'ANTHROPOGÉNÈSE.

Se basant sur les faits de répartition des groupes sanguins chez les différents peuples et l'hérédité mendélienne, H. et L. Hirszfeld ont émis l'hypothèse d'une origine séparée des groupes A et B, le premier en Occident, le deuxième en Orient. La répartition actuelle, d'après ces auteurs, est le résultat de l'interpénétration d'un groupe dans l'autre en des proportions différentes.

Bernstein, l'illustre mathématicien, a mis en avant dans ces derniers temps une autre hypothèse. Il admet l'existence de trois races primitives A, B, R, correspondant à trois facteurs héréditaires. La race R (groupe 0 de v. Dungern-Hirszfeld) est la plus répandue chez certaines populations de vieille origine et qui se trouvent à l'état presque pur comme, par exemple, les Esquimaux, les Indiens, les Philippins, les Australiens. De ce fait, Bernstein puis Snyder ont conclu que la race R (O) est la race primitive et que les races A et B se sont formées plus tard par mutation.

Se basant sur le fait que A diminue vers l'Orient et que B diminue très sensiblement au fur et à mesure que l'on se rapproche de l'ouest, Bernstein et quelques auteurs supposent que le groupe B est plus récent que le A.

Nombre d'auteurs présentent des objections. La priorité de la race R peut être discutée, surtout après les données des recherches d'un certain nombre d'auteurs qui ont constaté l'existence des groupes A et B chez les animaux et en particulier chez les singes anthropoïdes (v. Dungen-Hirsfeld, Landsteiner-Miller, Troisier).

Ottenberg, se basant sur l'indice biochimique et sur la rela-

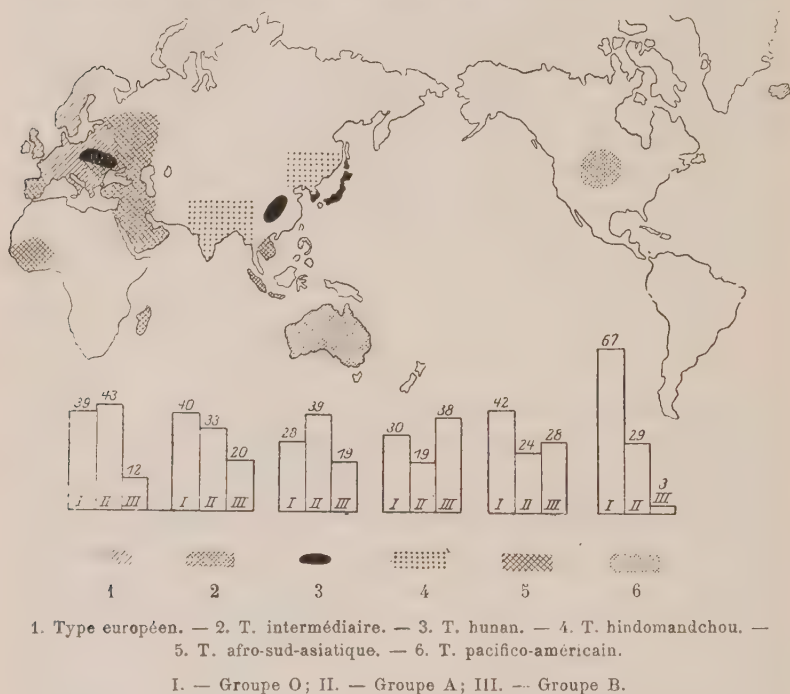


Fig. 5. — Répartition des groupes sanguins, d'après Ottenberg.

tion entre les différents groupes, classe tous les peuples du monde en six types anthropologiques :

I. Type européen. A ce type appartiennent les peuples de l'Europe occidentale et ceux de la péninsule Balkanique, avec un rapport : 0 — 39 p. 100; A — 43 p. 100; B — 12 p. 100; c'est-à-dire  $A > 0 > B$ . Indice — 3,0 — 4,0.

II. Type intermédiaire (Arabes, Turcs, Russes) où 0 — 40 p. 100; A — 33 p. 100; B — 20 p. 100; et où  $0 > A > B$ . Indice — 1,3 — 1,8.

III. Type afro-sud-asiatique (Nègres, Malgaches, Malais, Indochinois); où  $0 - 42$  p. 100;  $A - 24$  p. 100;  $B - 28$  p. 100; et où  $0 > B > A$ . Indice —  $0,8 - 1,4$ .

IV. Type Hindomandchou (Chinois du nord, Coréens, Tziganes, Hindous, Mandchous); où  $0 - 30$  p. 100;  $A - 19$  p. 100;  $B - 38$  p. 100; et où  $B > 0 > A$ . Indice —  $0,5 - 1,2$ .

V. Type Hunan (Chine méridionale, Japon, Hongrois, Juifs romains); où  $0 - 28$  p. 100;  $A - 39$  p. 100;  $B - 19$  p. 100 avec  $A > 0 > B$ . Indice —  $1,6 - 1,7$ .

VI. Type pacifico-américain (Indiens de l'Amérique du nord, Australiens, Philippins, Islandais) où  $0 - 67$  p. 100;  $A - 29$  p. 100;  $B - 3$  p. 100 et où  $0 > A > B$ . Indice —  $10,0$ .

Ottenberg a donné une carte de la répartition de ces types anthropologiques, que nous reproduisons ci-contre (fig. 5).

Bien que ces hypothèses doivent encore être vérifiées, nous pouvons déjà voir quelle grande valeur a l'étude des groupes sanguins pour élucider un certain nombre de questions d'anthropologie, et nous pouvons dire avec Hirszfeld que « la sérologie nous a donné un instrument qui, avec d'autres sciences, peut contribuer à la résolution des problèmes les plus profonds de l'origine des races humaines ».

## A. — Groupes sanguins chez les Français.

### RÈGLES DE L'HÉRÉDITÉ.

Nous avons examiné, au point de vue des groupes sanguins et de l'hérédité de ceux-ci, 178 familles françaises comprenant 571 enfants et une famille de quatre générations avec 35 personnes, en tout 962 personnes.

a) GROUPES SANGUINS. — Nous avons trouvé les chiffres suivants :

Appartiennent au groupe :

$A$ , 42,3 p. 100     $B$ , 11,1 p. 100     $AB$ , 4,5 p. 100     $0$ , 42,1 p. 100.

$$\text{Indice de Hirszfeld } \left( \frac{A + AB}{B + AB} \right) = 3,0.$$



Sur 962 personnes, nous avons examiné : hommes, 509; femmes : 453. Quant au groupement des sexes, les résultats sont les suivants :

	GROUPE SANGUIN				
	A	B	AB	0	INDICE
	p. 100	p. 100	p. 100	p. 100	
Hommes . . . . .	43,4	11,4	3,6	41,6	3,1
Femmes . . . . .	41,1	10,8	5,3	42,6	2,9

b) HÉRÉDITÉ DES GROUPE SANGUINS. — Cette question est capitale dans l'étude des groupes sanguins. Les premiers chercheurs, comme Langer, Hektoen, Ottenberg-Epstein, étudiant l'isohémoagglutination, ont remarqué que très souvent l'enfant a le même groupe que ses parents.

Dungern et Hirszfeld ont montré les premiers que les deux propriétés A et B, qui appartiennent aux globules rouges (agglutinogènes) et qui déterminent quatre groupes sanguins (A, B, AB, 0), sont héréditaires. L'hérédité des groupes obéit à la loi de Mendel; les propriétés A et B sont dominantes et l'absence de ces propriétés (groupe 0, « non A », « non B ») est récessive, c'est-à-dire que les propriétés A ou B n'apparaissent jamais chez un enfant si elles ne sont pas présentes chez l'un ou chez l'autre des deux parents. Et si elles manquent chez les deux parents, elles manquent aussi chez les enfants.

On peut résumer, de la façon suivante, les données actuellement acquises :

1° Si les parents ont le même groupe, c'est-à-dire s'ils ont le groupe A ou B, les enfants auront le même groupe que les parents (A ou B) ou le groupe récessif 0;

$$A + A = A, A, A, 0 \quad B + B = B, B, B, 0.$$

2° Si l'un des parents appartient au groupe A ou B et l'autre au groupe 0, le groupe dominant se trouve chez tous les enfants ou presque chez tous les enfants;

$$A + A = A, A, A, 0 \quad \text{ou souvent} \quad A, A, A, A.$$

c'est-à-dire, dans la plupart des cas, les enfants héritent de la propriété dominante;

3° Si les parents appartiennent tous deux au groupe récessif (0) les enfants auront le même groupe (0);

$$0 + 0 = 0, 0, 0, 0.$$

4° Si l'un des parents appartient au groupe A et l'autre au groupe B, les enfants peuvent appartenir à l'un quelconque des quatre groupes :

$$A + B = A, B, AB, 0.$$

5° Si l'un des parents appartient au groupe AB et l'autre au groupe 0, les enfants peuvent appartenir (d'après Dungern et Hirszfeld) à l'un quelconque des quatre groupes :

$$AB + 0 = A, B, AB, 0.$$

Cette dernière formule est contestée actuellement par une série d'auteurs qui ont accepté la formule héréditaire du mathématicien allemand Bernstein. Nous parlerons plus loin de cette nouvelle formule.

Se basant sur les faits, Dungern et Hirszfeld ont émis l'hypothèse que le groupe sanguin pourrait être la résultante de la combinaison des quatre caractères réunis en deux couples allélomorphes (conforme aux doctrines mendéliennes). Ces deux couples A et non-A, B et non-B, seraient indépendants l'un de l'autre et la combinaison de ces deux couples formerait les quatre groupes sanguins.

En 1924, Bernstein, se basant sur l'analyse mathématique, a soutenu que l'hypothèse des couples allélomorphes indépendants n'est pas exacte et a proposé une hypothèse de trois alléomorphes multiples A, B, R, où les facteurs A et B sont dominants et R récessif.

Nous ne pouvons pas entrer ici dans le détail de ces deux théories. Nous avons schématisé dans le tableau ci-après les conséquences qui résultent de ces deux conceptions au point de vue de l'hérédité des groupes :

GROUPES DES PARENTS	GROUPES DES ENFANTS D'APRÈS	
	Dungern et Hirszfeld	Bernstein
0-0 . . . . .	0	0
0-A . . . . .	0, A	0, A
0-B . . . . .	0, B	0, B
A-A . . . . .	0, A	0, A
B-B . . . . .	0, B	0, B
A-B . . . . .	0, A, B, AB	0, A, B, AB
0-AB . . . . .	0, A, B, AB	A, B
A-AB . . . . .	0, A, B, AB	A, B, AB
B-AB . . . . .	0, A, B, AB	A, B, AB
AB-AB . . . . .	0, A, B, AB	A, B, AB

L'examen de ce tableau montre que ces deux formules de l'hérédité prévoient un certain rapport entre les groupes des parents et ceux des enfants. Il y a coïncidence en ce qui concerne les groupes A, B, 0. Les prévisions sur la transmissibilité héréditaire seront identiques lorsque la combinaison matrimoniale comprend ces trois groupes seulement. Mais les opinions diffèrent lorsque l'un des parents appartient au groupe AB; d'après Dungern et Hirszfeld, les enfants peuvent appartenir à un groupe quelconque, tandis que d'après Bernstein ils ne peuvent appartenir au groupe 0.

D'après ce dernier auteur, si l'un des générateurs appartient au groupe AB, ses cellules génétiques renferment A ou B. Si un générateur s'accouple avec un individu du groupe 0, les enfants seront A ou B; si, au contraire, c'est avec des individus A ou B, les enfants ne peuvent pas être du groupe 0, c'est-à-dire que le produit 0 est incompatible avec la combinaison des parents 0-AB.

Les résultats des recherches sur l'hérédité des groupes sanguins que nous avons effectuées dans 478 familles françaises sont résumés dans le tableau.

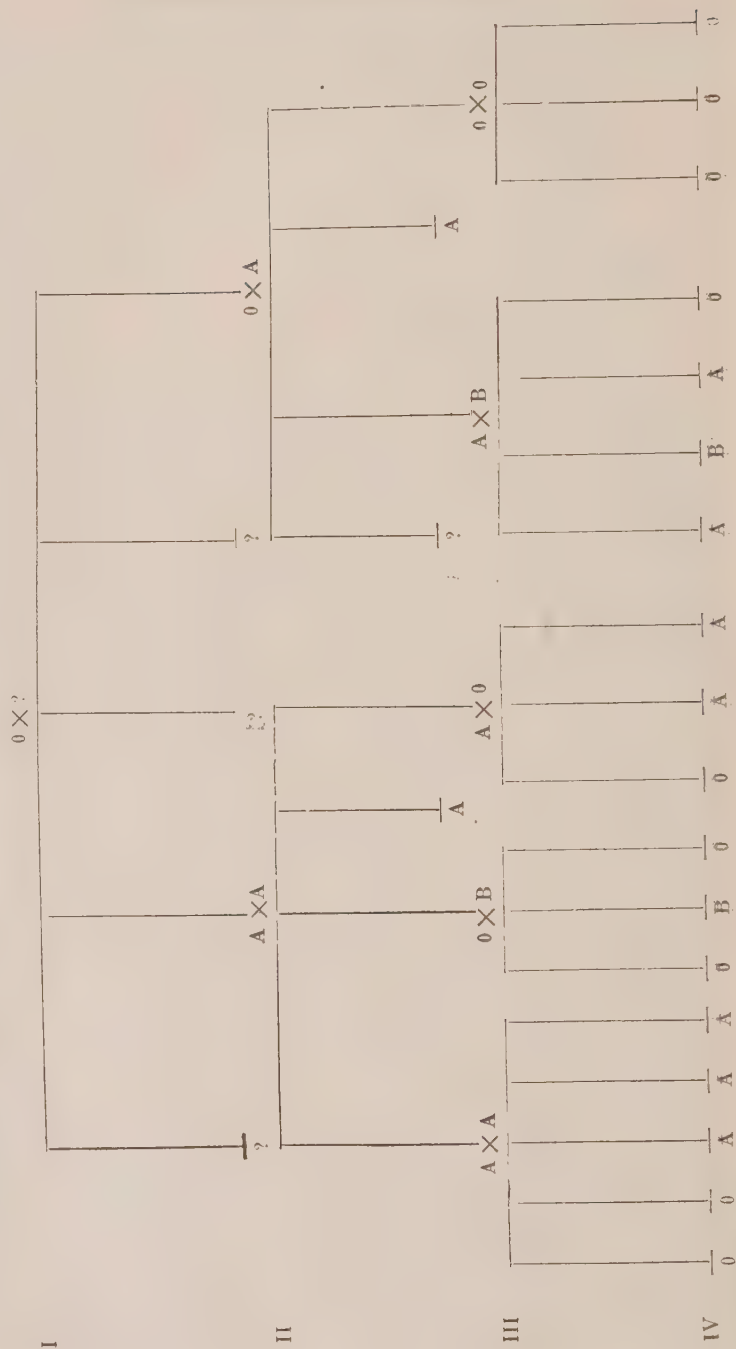
Il montre que nous n'avons trouvé aucune exception à la formule de Dungern-Hirszfeld, mais deux exceptions à celle de Bernstein. Si, dans le cas  $AB \times B$  avec enfant 0, on peut supposer l'illégitimité, le cas  $0 \times AB$  avec enfant 0 est une exception indiscutable à la formule de Bernstein.

Nous avons eu l'occasion d'examiner deux familles comprenant quatre générations. Le tableau (tableau IV) schématise le résultat de l'examen de l'une de ces familles.

TABLEAU III.

PARENTS		NOMBRE des familles	GROUPES DES ENFANTS						NOMBRE des enfants		
Père	Mère		0 (41,7 p. 100) ♂ (238)	A (44,5 p. 100) ♂ (254)	B (40,5 p. 100) ♂ (60)	AB (3,3 p. 100) ♂ (19)	0 (41,7 p. 100) ♀ (238)	A (44,5 p. 100) ♀ (254)		B (40,5 p. 100) ♀ (60)	AB (3,3 p. 100) ♀ (19)
0	0	39	55	—	—	—	—	—	—	—	404
0	A	29	24	31	—	—	—	—	—	—	97
A	0	33	26	37	—	—	—	—	—	—	414
A	A	21	42	31	—	—	—	—	—	—	77
0	B	3	2	—	—	—	—	—	—	—	8
B	0	4	4	—	—	—	—	—	—	—	43
B	B	2	2	—	—	—	—	—	—	—	8
A	B	14	4	40	—	—	—	—	—	—	33
B	A	11	3	9	—	—	—	—	—	—	37
AB	AB	2	—	1	—	—	—	—	—	—	5
0	AB	4	1	5	—	—	—	—	—	—	15
0	0	1	—	1	—	—	—	—	—	—	3
A	AB	5	—	6	—	—	—	—	—	—	19
AB	A	3	—	2	—	—	—	—	—	—	43
B	AB	5	—	4	—	—	—	—	—	—	46
AB	B	2	—	3	—	—	—	—	—	—	9
Total . . . .		478	430	440	414	33	27	40	9	574	

TABLEAU IV. — Arbre généalogique à quatre générations comprenant 35 personnes d'une même famille (13 du sexe masculin ♂ et 17 du sexe féminin ♀).





L'analyse des résultats de nos recherches, consignés dans les tableaux III et IV, nous permet de confirmer la valeur du point capital mis en évidence par Dungern et Hirszfeld : les propriétés isoagglutinables (agglutinogènes) présentes chez les parents passent souvent chez les enfants, mais peuvent aussi y manquer, tandis qu'elles ne peuvent exister chez les enfants si elles manquent chez les parents.

### B. — Groupes sanguins chez les Tchèques.

Nous nous sommes proposé de rechercher la proportion quantitative existant entre les groupes A et B chez les Tchèques.

Dans ce but, nous avons examiné le sang de 218 soldats d'une garnison tchèque. Nous n'avons retenu pour nos recherches que des soldats descendant de parents et grands-parents tchèques.

Nous avons obtenu les résultats suivants : groupe A : 40 p. 100; groupe B : 42,4 p. 100; AB : 7,8 p. 100; 0 : 39,2 p. 100; indice : 2,4.

Il en résulte que les Tchèques, au point de vue sérolo-anthropologique, occupent une place entre les Autrichiens (indice : 2,6 [Landsteiner]), les Serbes et les Bulgares (indice : 2,3 [L. et H. Hirszfeld]) et que, parmi les peuples slaves, ils sont les plus proches du type européen (indice : 1,6 chez les Polonais; indice : 1,3 chez les Russes).

### C. — Relations entre les groupes sanguins des Arméniens et les autres caractères anthropométriques de cette race.

Nous avons recherché, comparativement aux caractères anthropométriques, la proportion quantitative existant entre les groupes A et B, chez les Arméniens, peuple qui offre un intérêt spécial au point de vue sérolo-anthropologique. En tant que chrétiens, ils ne sont pas mélangés avec les peuples qui les entourent, fait qui donne le droit de supposer à la race quelque pureté.

a) Indiquons d'abord les résultats de nos examens anthropométriques.

Nous avons examiné 380 Arméniens réfugiés de Turquie, Perse, Caucase et originaires de 35 villes ou villages divers de ces pays.

Hommes . . . . .	239 (62,9 p. 100)
Femmes . . . . .	141 (37,1 p. 100)

Parmi ces 380 personnes, il y avait 9 enfants de six à neuf ans qui n'ont pas figuré dans les résultats des études anthropométriques.

La moyenne d'âge était de trente et un ans à trente-six ans (maximum : 62; minimum : 16).

Les mensurations ont donné les résultats suivants : la taille moyenne des deux sexes réunis est : 162 cent. 1 (maximum : 182; minimum : 140); pour les sexes : hommes : 166 cent. 4 (maximum : 182; minimum : 140); femmes : 154 cent. 7 (maximum : 175; minimum : 140). La différence moyenne de taille entre les deux sexes est de 11 cent. 7.

Sur un chiffre total de 371 (380 — 9 enfants), nous avons trouvé pour la taille :

	POURCENTAGE
Moins de 160 . . . . .	34,8
160,1 à 165 . . . . .	18,8
165,1 à 170 . . . . .	26,1
170 et au-dessus . . . . .	20,3

TÊTE. — Indice céphalique : moyenne pour les deux sexes réunis : 83,61 (brachycéphalie). Chez les hommes : 83,01; chez les femmes : 84,74.

Nous avons classé par l'indice céphalique en nous basant sur la classification de Deniker. Si nous prenons l'indice 82,0 comme limite entre la dolichocéphalie et la brachycéphalie, nous avons pour les Arméniens :

	POURCENTAGE
Brachycéphales . . . . .	65,4
Mésaticéphales . . . . .	19,0
Sous-dolichocéphales et dolichocéphales . . . . .	14,7

Il est important de signaler qu'il y a plus de brachycéphales

parmi les femmes que parmi les hommes. Les proportions suivant les sexes sont du reste les suivantes :

	HOMMES p. 100	FEMMES p. 100
Indice céphalique 79 . . . . .	45,8	43,2
Mésaticéphales . . . . .	24,8	40,9
Brachycéphales . . . . .	59,4	75,8

FACE. — Indice facial moyen pour les deux sexes réunis : 90,77. Il n'y a aucune différence entre les deux sexes. Pour les deux sexes, indice facial :

	HOMMES p. 100	FEMMES p. 100
Moins de 80 à 85 . . . . .	16,3	10,2
85,1 à 95 . . . . .	64,9	81,0
95,1 et au-dessus . . . . .	18,8	8,8

NEZ. — Indice nasal moyen : 60,94; pour les hommes : 61,9; pour les femmes : 59,17. L'indice nasal est pour les deux sexes :

	POURCENTAGE
Moins de 69 . . . . .	91,1
70 à 84,9 . . . . .	8,3
85 et au-dessus . . . . .	0,6

dans les deux sexes :

	HOMMES p. 100	FEMMES p. 100
69,9 . . . . .	88,5	93,6
70 à 84,9 . . . . .	11,1	3,6
85 et au-dessus . . . . .	0,4	0,8

Ces chiffres montrent que les Arméniens sont des leptorhiniens dans les deux sexes.

PEAU. — La coloration de la peau indique la moyenne suivante :

Mélanine . . . . .	0,22
Xanthine . . . . .	1

(nous avons compté entre 1 et 5). Il n'y a pas à ce point de vue de différence sensible entre les deux sexes. Il en est de même pour la coloration des cheveux.

Pour les yeux, les moyennes sont pour les deux sexes réunis :

	MÉLANINE	XANTHINE	VERT	BLEU
Les deux sexes . . . . .	2,6	1,2	0,2	0,3
Pour les hommes . . . . .	2,6	1,3	0,2	0,1
Pour les femmes . . . . .	2,7	1,2	0,3	0,4

Ces chiffres montrent une différence dans la couleur des yeux suivant les sexes et surtout la prédominance de la pigmentation chez la femme.

Nous avons relevé un fait intéressant : la teinte verte et bleue des yeux est héritée des mères dans 74 p. 100 des cas et des pères dans 26 p. 100 des cas.

En résumé, ces chiffres établissent que les Arméniens constituent une race de taille moyenne; brachycéphale très accentuée; leptoprosopé; leptorhinien dans les deux sexes avec une pigmentation mate de la peau, des cheveux bruns, avec reflet jaunâtre et rougeâtre, des yeux bruns avec des pigmentations jaunes, vertes ou bleues.

b) Comparativement à ces données anthropologiques, nous avons étudié la répartition des groupes sanguins chez les Arméniens et nous avons trouvé les chiffres suivants :

A	B	AB	0
40,3 p. 100	16,6 p. 100	6,8 p. 100	36,3 p. 100

Indice d'Hirszfeld : 2,01.

dont les races (suivant Bernstein) sont :

A	B	R	$p + q + r$
0,282	0,116	0,603	1,001

L'examen de ces chiffres permet de conclure que la race arménienne :

1° Par ses caractéristiques sanguines se rapproche des races de l'Europe (surtout des peuples balkaniques : Grecs : 41,6; Serbes : 41,8; Bulgares : 40,6);

2° Par le chiffre du groupe B, se rattache aux peuples de l'Est et du Sud-Est de l'Europe (Serbes : 15,6; Grecs : 16,2; Turcs : 18,6; Arabes : 19,0);

# SERVICE DE SÉROLOGIE

Lieu de naissance :

Nom	.....	Le sujet	.....	<div style="display: flex; align-items: center; justify-content: center;"> <div style="text-align: center; margin-right: 10px;"> <b>Vivants</b>  <b>Enfants</b>  <b>Morts</b> </div> <div style="font-size: 2em;">{</div> </div>
Prénoms	.....	Le père	.....	
Sexe	.....	La mère	.....	
Age	.....		.....	

## RECHERCHES MORPHOLOGIQUES ET ANTHROPOMÉTRIQUES

Yeux .....  
Couleur { Peau .....  
Cheveux .....  
Taille { .....

TÊTE		FACE		NEZ	
a-p	tr	n m	bizyg.	Hauteur	Indice

Groupe sanguin

Date \_\_\_\_\_

Examen fait par

*Le Chef du Service de Sérologie :*

# Empreinte digitale




# OBSERVATIONS

# GROUPES SANGUINS

Des parents { Père ..... n° ..... V. Série ..... Mère ..... n° ..... V. Série ..... Des enfants ..... n° ..... V. Série ..... }

3° Par la quantité du sang R, elle se rattache aux peuples de l'Est (Grecs : 0,618; Serbes : 0,616; Turcs : 0,607).

Nos recherches ont confirmé le fait signalé par L. et H. Hirszfeld que la quantité du groupe B augmente au fur et à mesure que l'on se rapproche de l'Est et du Sud-Est de l'Asie.

Au point de vue de la répartition géographique (villes, villages), parmi les régions où l'on rencontre des individus possédant le sang A en quantité au-dessus de la moyenne indiquée pour l'Arménie, il faut citer les régions suivantes : Constantinople (61,9 p. 100), Kars (61,5 p. 100), Smyrne (56,5 p. 100), Césarée (50 p. 100), Ismit (44,2 p. 100), Erzeroum (40,0 p. 100). Dans les autres régions, la quantité du sang A est inférieure à la moyenne.

Les individus appartenant au groupe A sont dispersés dans toute l'Arménie et la répartition du groupe A ne permet pas d'admettre que les régions occidentales sont plus riches en groupe A que les régions orientales ou centrales.

Dans les régions de Diarbekir et Kharpout, la quantité du sang B est égale à celle du groupe A. Dans les régions suivantes, elle est au-dessus de la moyenne pour l'Arménie : Constantinople (19,0 p. 100), Césarée (28,7 p. 100), Ismit (23,1 p. 100), Sivas (19,0 p. 100), Diarbekir (25,0 p. 100), Kharpout (20,0 p. 100).

Si on étudie les rapports entre la taille et les groupes sanguins, on voit que chez les individus, où le groupe A est prédominant, la taille est au-dessous de la moyenne, tandis que pour le groupe 0 la taille est au-dessus de la moyenne.

Si l'on compare les groupes sanguins avec les autres indices anthropométriques, on voit, en résumé, que la moyenne du diamètre  $a-p$  est plus grande chez les individus du groupe 0, plus petite chez ceux du groupe A. Pour le diamètre transverse, il n'existe pas de différence sensible.

L'indice céphalique est plus grand pour le groupe B, plus petit pour le groupe 0.

Si on compare entre elles les données suivantes : taille, indice céphalique, groupes sanguins, on est frappé par le fait que les groupes A et B correspondent à une taille petite et à une brachycéphalie plus accentuée ; que le groupe 0 correspond à une taille plus élevée et à un indice céphalique qui est

inférieur à celui qui correspond aux deux premiers groupes.

L'ensemble de ces données tend à prouver que la race arménienne ne constitue pas une race homogène. On peut en conclure, d'une façon plus générale, que la comparaison entre les groupes sanguins et les autres caractères anthropométriques peut constituer une méthode intéressante d'étude d'une race.

Afin de pouvoir continuer ces recherches comparatives entre les données sérologiques et les données anthropologiques, nous avons créé un type uniforme de fiches (pages 133-136). Le travail en est simplifié et les résultats obtenus facilement comparés.

#### D. — Groupes sanguins. des indigènes de l'Afrique équatoriale française.

Sur notre conseil, nos collaborateurs Liodt et Pojarski ont examiné le sang des indigènes de la région de Moncagni, subdivision de Mossendjo, Moyen-Congo (A. E. F.). Les résultats ont été les suivants; sur 400 personnes examinées :

	POURCENTAGE
A . . . . .	27
B . . . . .	26
AB . . . . .	6
0 . . . . .	41

Indice d'Hirszfeld : 1,03.

Pour les différentes races examinées, les proportions ont été :

RACES	A	B	AB	0
Myongo . . . . .	26,4	27,0	5,5	41,1
Babongo . . . . .	26,3	26,0	5,9	41,8
Batzengué . . . . .	27,6	25,8	6,1	40,5
Bandzabi . . . . .	27,1	26,0	6,3	40,6
Bakota . . . . .	27,6	26,2	6,2	40,8

Les indigènes de la région étudiée ne diffèrent donc pas beaucoup entre eux par la proportion de leurs groupes sanguins et on peut considérer qu'ils ont une origine commune.

\*  
\* \*

Ces données — et particulièrement celles qui ont trait à l'étude des races et à l'hérédité des groupes sanguins — ont trouvé en médecine légale une application immédiate. C'est le mérite du professeur L. Lattes d'avoir montré, en de remarquables travaux, toute l'importance de cette application. Nous ne pouvons insister sur cette question que nous avons longuement étudiée ailleurs (1). Donnons cependant quelques exemples :

a) RECHERCHE DE LA PATERNITÉ. — Nombre de tribunaux, particulièrement en Autriche, en Allemagne et en Amérique, ont déjà basé leurs jugements sur les résultats donnés par la recherche des groupes sanguins. En voici deux exemples :

Dans un cas (tribunal de Vienne), la mère appartenait au groupe A, le père « supposé » (poursuivi en reconnaissance de paternité) au groupe 0, l'enfant au groupe B. Le père véritable de l'enfant devait donc obligatoirement appartenir au groupe B ou AB et on pouvait éliminer avec certitude tous les hommes appartenant aux groupes A ou 0. Dans le cas particulier, l'accusation ne pouvait donc être retenue ; du reste, devant ces faits, la mère fit des aveux qui confirmèrent les résultats fournis par le laboratoire :

Voici, d'autre part, l'histoire très résumée d'un récent procès qui a fait grand bruit à Berlin (un verdict judiciaire basé sur les groupes sanguins, *Reichsgesundheitsblatt*, 1926, p. 726) :

Le sieur M..., divorcé, accuse M. K. Sch... d'être le père de ses deux enfants, Caroline et Guillaume. La recherche des groupes sanguins de l'accusé Sch... et de M<sup>me</sup> M... a montré que tous les deux appartiennent au groupe 0. Leur sang ne contient ni agglutinogène A, ni agglutinogène B. Or, l'enfant Guillaume a dans son sang l'agglutinogène A et Caroline l'agglutinogène B. Leurs agglutinogènes doivent venir de leur père, puisque leur mère ne les a pas. Et l'accusé K. Sch..., qui n'appartient ni au groupe A, ni au groupe B, ne peut être le père des enfants Caroline et Guillaume M...

(1) *Ann. Méd. légale*, n° 7, 1927 et n° 2, 1928.

De même, dans des cas d'infanticide, la détermination comparée des groupes sanguins chez l'enfant et chez les parents soupçonnés de ce crime peut éviter parfois des erreurs judiciaires.

Enfin, la recherche des groupes sanguins a pu être utile dans d'autres cas, comme le prouve le cas suivant que nous avons observé :

Dans une maternité, l'infirmière a pris pour les laver deux enfants (garçons) de deux mères qui viennent d'accoucher, mais ayant enlevé par mégarde les marques qui servaient pour l'identification, elle ne sait plus à quelle mère appartient chaque enfant; la recherche des groupes sanguins donna ici des résultats très probants :

## FAMILLE M.

—  
Mère A.

Père A.

## FAMILLE P.

—  
Mère B.

Père A.

Les enfants appartenaient :

- I au groupe A.
- II au groupe B.

Le premier de ces enfants qui répondait au groupe A pouvait appartenir à l'une quelconque des deux familles; mais le second, qui répondait au groupe B ne pouvait appartenir qu'à la famille P... Un peu plus tard, certains caractères familiaux confirmèrent le bien-fondé de la conclusion qu'avait permis de tirer l'étude des groupes sanguins.

b) RECHERCHE ET IDENTIFICATION DES CRIMINELS. — Dans l'étude si importante des taches sanguines, les méthodes de laboratoire dont nous disposons actuellement permettent seulement de déterminer si le sang provient de l'homme ou d'un animal. On conçoit combien pourtant il serait intéressant de pousser plus loin la détermination et de préciser si le sang provient de la victime ou du meurtrier.

L'identité, et par suite la race de la victime, est habituellement connue. S'il est possible de prouver, par l'étude des groupes sanguins, que le sang trouvé ne peut provenir de la



victime la recherche du meurtrier pourra être de ce fait grandement facilitée.

Les recherches sur les groupes sanguins des diverses races humaines peuvent être utilisées par le médecin légiste qui pourra parfois, grâce à ce procédé, orienter les recherches de la police vers un individu appartenant à telle ou telle race. Et voici comment :

On sait que non seulement les groupes sanguins sont différents suivant les diverses races humaines, mais qu'il existe de plus une certaine régularité dans la distribution géographique des groupes.

Supposons que le sang des taches fasse partie du même groupe que celui du cadavre. On pourrait en conclure que ce sang des taches appartient à la victime, mais il est possible aussi que le sang du meurtrier se classe par hasard dans le même groupe sanguin que celui de la victime. Le cas qui nous intéresse — et il doit être le plus fréquent — est celui où le sang des taches appartient à un autre groupe que le sang du cadavre.

Si, sur les fiches des récidivistes, sont marqués — comme nous l'avons suggéré — les groupements sanguins, on peut arriver, par voie d'élimination, à trouver le criminel parmi les individus possédant le même groupe sanguin que celui révélé par l'examen des taches. Par exemple, on a trouvé des taches sanguines appartenant au groupe A. Comme nous l'avons dit plus haut, les Français appartiennent au groupe A dans la proportion de 42,6 p. 100 ; les récidivistes et individus suspects n'appartenant pas à ce groupe peuvent être éliminés. Evidemment, on ne les élimine qu'au point de vue des taches sanguines, car ils peuvent avoir participé à l'affaire sans laisser de traces de sang. Inversement, on peut faire porter spécialement les recherches sur les récidivistes qui appartiennent au groupe sanguin trouvé.

Supposons un cas heureux : le sang trouvé appartient au groupe AB. A ce groupe appartiennent 3 p. 100 des Français ; les recherches parmi les récidivistes sont alors faciles. Au groupe B appartiennent 11,2 p. 100 des Français : pour rechercher l'auteur de l'agression, on peut donc éliminer 88 p. 100 des récidivistes.

Ainsi l'étude des groupes sanguins — qui a pour elle le grand

mérite de la simplicité — peut rendre d'importants services pour la recherche et l'identification des criminels. Bien entendu, les renseignements fournis par cette étude ne seront pas ordinairement suffisants à eux seuls pour éclairer la justice, mais ils pourront soit aider à orienter les recherches vers des individus suspects, des récidivistes, par exemple, dont le groupe sanguin serait connu, soit à indiquer des probabilités de race, soit surtout à innocenter avec certitude des inculpés. Il serait donc important que le *groupe sanguin figurât sur la fiche d'identité des criminels ou condamnés de droit commun*.

Le problème de la recherche de la paternité, qui était parfois presque insoluble pour le Tribunal, sera souvent résolu pour la détermination des groupes sanguins de la mère, de l'enfant et du « père supposé ». Certes, cette recherche de laboratoire sera bien des fois faite sans résultat, mais il suffit, pour souligner sa valeur, d'indiquer qu'il y a des cas, assez nombreux du reste, où elle pourra permettre avec certitude de disculper un accusé.

#### E. — Groupes sanguins dans quelques états pathologiques.

Il nous a paru intéressant d'étudier les groupes sanguins au cours de divers états pathologiques, non pour savoir s'ils sont modifiés par ces états pathologiques — question qui semble aujourd'hui résolue par la négative — mais pour rechercher si, chez des individus appartenant à tel ou tel groupe sanguin, une affection est plus ou moins souvent rencontrée ou si elle évolue d'une façon particulière. Nos recherches ont porté sur un certain nombre de maladies (tuberculose, cancer, psoriasis, eczéma).

Nous avons examiné des tuberculeux hospitalisés dans plusieurs services parisiens et atteints de formes très diverses (cas légers, graves, très graves, évolution lente ou rapide; formes fibreuses, cavitaires, hémoptoïques; dans presque tous les cas, la présence du bacille de Koch avait été établie par des recherches de laboratoire); le hasard a fait que les formes hémoptoïques ont été les plus nombreuses.

Le tableau suivant indique la répartition générale des groupes sanguins examinés :

TABLEAU I.

Cas examinés : 316. { Hommes . . . . . 197 (62,3 p. 100)  
 { Femmes . . . . . 119 (37,7 p. 100)

GROUPES SANGUINS Chiffres normaux chez les Français		GROUPES SANGUINS des sujets examinés		DIFFÉRENCE
A	42,6	155	49,1 p. 100	+
B	11,2	23	7,2 p. 100	—
AB	3,0	25	7,9 p. 100	+
O	43,2	113	35,8 p. 100	—

Ce premier tableau montre la prédominance des groupes A et AB chez les sujets examinés par rapport à la normale chez les Français.

Le tableau II indique la répartition suivant les sexes :

TABLEAU II.

*Hommes : 197 cas.*

A	P. 100	N	B	P. 100	N	AB	P. 100	N	O	P. 100	N
97	49,2	+	16	8,1	—	17	8,6	+	67	34	—

*Femmes : 119 cas.*

58	48,7	+	7	5,8	—	8	6,7	+	46	38,6	—
----	------	---	---	-----	---	---	-----	---	----	------	---

On voit que la prédominance de A et AB existe dans les deux sexes.

Les formes hémoptoïques nous ayant paru présenter, au point de vue des groupes sanguins, certaines particularités, nous donnons dans le tableau ci-dessous le détail de nos résultats dans ce cas particulier :

TABLEAU III.

*Hémoptysies : 84 cas (26,5 p. 100).*

Total (84 = 26,5 p. 100) N.

Hommes (59 = 70,2 p. 100) N. Femmes (25 = 29 p. 100) N.

A	P. 100	N	B	P. 100	N	AB	P. 100	N	O	P. 100	N
29	34,7	—	3	3,4	—	14	16,6	+	38	45,2	+
21	35,6	—	3	5,0	—	8	13,7	+	27	45,7	+
8	32,0	—	0	0,0	—	6	24,0	+	11	44,0	+

De l'examen de ces trois tableaux un fait se dégage, très net, la prédominance du groupe A et surtout du groupe AB; cette prédominance paraît tenir à la grande proportion que nous avons eue de formes hémoptoïques, formes pour lesquelles le groupe AB prédomine nettement.

Ces caractères sont-ils héréditaires? On sait que les travaux récents de Hirszfeld (1) et de son école ont montré que le groupe sanguin d'un enfant ayant une réaction de Schick positive correspond au groupe sanguin de celui, père ou mère, qui a un Schick positif. Par exemple, père A, mère B, enfant B. Si l'enfant (B) a un Schick positif, c'est la mère (B) qui a également un Schick positif. Nous poursuivons des recherches pour essayer d'établir par analogie, qu'en matière de tuberculose, une certaine prédisposition ou tout au moins le mode d'évolution de la maladie est en rapport avec le groupe sanguin des enfants de tuberculeux, que l'enfant tuberculeux appartient au même groupe sanguin que celui des deux, père et mère, qui est tuberculeux. Nous avons quelques cas paraissant confirmer cette hypothèse, mais ils sont peu nombreux, étant donné les grandes difficultés que nous rencontrons pour poursuivre ces recherches dans les familles.

Nous avons examiné un certain nombre de cancéreux et de malades atteints d'affections cutanées : psoriasis et eczéma. Voici les résultats obtenus :

*Cancer (50 cas). Groupes sanguins.*

	POURCENTAGE
A . . . . .	41,7
B . . . . .	16,6
AB . . . . .	0
O . . . . .	41,7

*Psoriasis (21 cas). Groupes sanguins.*

	P. 100	N
A . . . . .	33,3	—
B . . . . .	9,5	—
AB . . . . .	4,8	—
O . . . . .	52,4	+

(1) *Klinische Woch.*, 26, 1924.

*Eczéma (78 cas). Groupes sanguins.*

	TOTAL p. 100	N	HOMMES p. 100	N	FEMMES p. 100	N
A . . . . .	39,7	—	37,0	—	41,1	—
B . . . . .	9,0	—	11,1	—	7,9	—
AB . . . . .	3,9	—	3,7	—	3,9	—
O . . . . .	47,4	+	48,2	+	47,1	+

On note : pour le cancer une légère augmentation pour le groupe B et surtout une absence complète du groupe AB que nous avons vu au contraire en augmentation sensible chez certains tuberculeux ; pour le psoriasis et pour l'eczéma une augmentation nette du groupe O.

Nous donnons ici les chiffres tels que les examens de sang que nous avons pratiqués nous les ont apportés. Les différences sont-elles le fait du hasard ou correspondent-elles à des facteurs constitutionnels déterminant des conditions évolutives plus ou moins favorables ? C'est ce que nous apprendront les recherches en série que nous poursuivons actuellement, mais d'ores et déjà les chiffres que nous apportons paraissent suffisants pour indiquer une *orientation*.

## F. — Groupes sanguins des animaux.

Nos études ont porté sur le sang de cheval et nous nous sommes posé le problème de savoir s'il est possible d'établir chez les chevaux une classification par groupes comme chez l'homme.

Nous avons au total examiné 105 chevaux répartis en 7 séries de 15. Nous donnons, à titre d'exemple, les résultats pour une série. Les sérums agglutinants sont des sérums de chevaux dont on a étudié l'action sur les globules rouges de leurs congénères (tableau I). Nous avons constaté que l'on peut distinguer, comme chez l'homme, 4 groupes sanguins, avec des exceptions toutefois (tableau II).

Au total, pour les 105 chevaux : A = 32 p. 100 ; B = 16 p. 100 ; AB = 39 p. 100 (pas d'agglutinine) ; O = 13 p. 100 (pas d'agglutino-gène) ; ni agglutinine, ni agglutinogène = 4 cas.



TABLEAU I. — I, II, etc., sérums des chevaux  
agissant sur les globules des mêmes chevaux 1, 2 etc.

SÉRUM	GLOBULES ROUGES														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
I . . . . .	—	+	+	—	+	+	—	+	+	+	—	+	+	—	+
II . . . . .	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
III . . . . .	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
IV . . . . .	—	+	+	—	+	+	—	+	+	+	—	+	+	—	+
V . . . . .	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
VI . . . . .	+	+	+	+	+	—	+	+	+	—	—	+	+	—	+
VII . . . . .	—	+	+	—	+	+	—	+	+	+	—	+	+	—	+
VIII . . . . .	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
IX . . . . .	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
X . . . . .	+	+	+	+	+	—	+	+	+	—	—	+	+	—	+
XI . . . . .	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	+	+	—	+
XII . . . . .	+	+	+	+	+	—	+	+	+	—	—	—	+	—	+
XIII . . . . .	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
XIV . . . . .	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	+	+	+	—	+
XV . . . . .	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

TABLEAU II. — Classification par groupes.  
A, B, etc., globules (agglutinogènes).  $\alpha$ ,  $\beta$ , etc., sérums (agglutinines).

GLOBULES ROUGES																
SÉRUM	A			B			AB						0			
	1	4	7	6	10	12	2	3	5	8	9	13	15	11	14	
$\alpha$	I . . . . .	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	
	IV . . . . .	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	
	VII . . . . .	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	
$\beta$	VI . . . . .	+	+	+	—	—	+	+	+	+	+	+	+	—	—	
	X . . . . .	+	+	+	—	—	+	+	+	+	+	+	+	—	—	
	XII . . . . .	+	+	+	—	—	+	+	+	+	+	+	+	—	—	
0	II . . . . .	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
	III . . . . .	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
	V . . . . .	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
	VIII . . . . .	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
	IX . . . . .	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
	XIII . . . . .	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
$\alpha\beta$	XV . . . . .	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
	XI . . . . .	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	
	XIV . . . . .	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	

Ces tableaux montrent que, contrairement à ce qui se passe chez l'homme, le groupe AB est fréquent et qu'il existe un

petit nombre de cas où le sang ne possède ni agglutinines, ni agglutinogènes.

Nous avons mis en présence de globules d'homme provenant de différents donneurs les sérums de 20 chevaux : pour des globules appartenant soit au groupe A, soit au groupe B, l'agglutination a été positive dans une proportion de 80 p. 100. Les globules du groupe 0 n'ont été agglutinés par aucun sérum de cheval.

Nous poursuivons actuellement ces recherches, dans le but de déterminer s'il existe une relation entre les réactions agglutinantes du sérum de cheval et des globules d'homme et la présence ou l'intensité des phénomènes sériques chez les malades auxquels on a injecté du sérum de cheval.

Pour compléter cette étude, nous avons, pour certains chevaux producteurs de sérum antitétanique, comparé le groupe sanguin de leurs globules et le pouvoir antitoxique de leur sérum. Voici, par exemple, les résultats donnés par une série :

CHEVAUX	GR OUPE	UNITÉS
484 . . . . .	A	300
612 . . . . .	AB	1.000
675 . . . . .	B	1.000
365 . . . . .	A	300
637 . . . . .	0	1.600
305 . . . . .	AB	3.800
505 . . . . .	AB	900
57 . . . . .	B	1.000
303 . . . . .	AB	3.600
292 . . . . .	AB	500
619 . . . . .	A	1.600
495 . . . . .	AB	150
613 . . . . .	AB	850

D'après les recherches que nous avons faites, du reste encore trop peu nombreuses et dont les résultats sont analogues, en général, à ceux indiqués dans le tableau précédent, il semble difficile de mettre en évidence un rapport entre la variété de groupes sanguins et le pouvoir antitoxique du sérum.

L'étude des groupes sanguins chez les animaux présente un intérêt théorique et pratique : identification zoologique, rapprochement entre les espèces mais aussi vérification du pedigree (hérédité des groupes sanguins) de certains animaux de luxe (chevaux de courses, chiens de luxe), etc.

**G. — Recherches sur l'action réciproque  
des sérums et des hématies  
sur le mécanisme de l'agglutination et de l'adsorption**

**A. ORIGINE DES AGGLUTINOGENES.** — Il nous a paru intéressant de préciser où se trouvent, dans les globules rouges, les substances A et B (agglutinogènes): dans le stroma, dans l'hémoglobine ou dans les deux à la fois ?

**I.** — Nos expériences ont consisté tout d'abord à pratiquer des agglutinations avec le stroma préalablement séparé de l'hémoglobine.

**1° Séparation du stroma.** — *a)* On défibrine 10 cent. cubes d'un sang, dont on a préalablement déterminé le groupe: on sépare les globules par centrifugation et lavages répétés à l'eau physiologique. On peut aussi utiliser le caillot d'un sang dont on a déjà employé le sérum pour la réaction de Bordet-Wassermann, ce qui permet de se procurer facilement un matériel toujours abondant dans les laboratoires de sérologie et de multiplier ainsi les expériences. Le caillot préalablement dépourvu de son sérum est repris par l'eau physiologique; on mélange en agitant le tube; on centrifuge, on enlève le liquide surnageant et on pratique encore deux ou trois lavages à l'eau physiologique.

*b)* On hémolyse ensuite les globules rouges en utilisant le procédé le plus simple, c'est-à-dire en leur ajoutant de l'eau distillée (1 partie de globules rouges, 9 parties d'eau distillée). On doit ajouter l'eau très lentement sous peine de détruire le stroma (stromatolyse). Par simple centrifugation, on obtient les stromas globulaires dont on peut faire une émulsion.

**2° Agglutination.** — Avec une pipette Pasteur on dépose sur une lame une grosse goutte de l'émulsion de stroma; on ajoute une quantité égale de sérum agglutinant  $\alpha$ ; sur une autre lame on répète la même opération avec du sérum agglutinant  $\beta$ ; on agite et on observe macroscopiquement l'apparition de l'agglutination.

On peut adapter aussi à cette étude la technique de Hirszfeld: dans deux tubes à hémolyse, on verse pour chacun 1 c.c. 5

d'émulsion de stroma; on ajoute dans l'un II gouttes (0 c.c. 4) de sérum  $\alpha$  et dans l'autre II gouttes de sérum  $\beta$ . On agite, on laisse quelques heures à la température du laboratoire, puis on lit les résultats.

Dans les 2 cas, les résultats sont analogues à ceux obtenus avec les globules entiers mais les amas d'agglutination sont plus pâles qu'avec ces derniers.

II. — Dans une deuxième série d'expériences, nous avons étudié le phénomène d'agglutination en fonction de la réadsorption de l'hémoglobine.

Si, après avoir hémolysé les globules dans un tube et fait agglutiner les stromas par un sérum correspondant, on ajoute au mélange une quantité suffisante de NaCl pour le ramener à l'isotonie, on voit les agglutinats de stroma persister et reprendre une coloration rouge par suite de la réadsorption de l'hémoglobine.

Le phénomène peut être observé sur une lame avec la même netteté. Pour cela, on place sur une lame I goutte d'émulsion de globules rouges; on ajoute quelques gouttes d'eau distillée, l'hémolyse se produit. On ajoute le sérum agglutinant  $\alpha$  ou  $\beta$  et on laisse l'agglutination s'établir complètement. On ajoute alors quelques gouttes d'une solution hypertonique de NaCl. Les amas persistent et redeviennent rouges. Sans doute la couleur n'est pas aussi intense qu'avec des globules rouges normaux, mais la différence de teinte des agglutinats avant et après l'addition de NaCl est fort sensible. Le phénomène est particulièrement net quand on travaille avec le champ noir.

Reprenant l'expérience en sens inverse nous avons fait agir le liquide hémolysant (eau distillée) sur des globules rouges entiers déjà agglutinés par un sérum correspondant. Les agglutinats restent au fond du tube mais deviennent plus pâles. Ici encore on constate qu'en isotonisant le mélange le phénomène d'agglutination ne se modifie pas. Par agitation les agglutinats se dissocient, mais au bout de quelques instants de repos ils retombent au fond du tube sous la forme de flocons roses.

On obtient les mêmes résultats en hémolysant les globules rouges par un refroidissement de vingt-quatre heures à la glacière suivi d'un chauffage brusque au bain-marie à 56°. Mais nous n'avons jamais réussi à obtenir la réadsorption dans le

cas où l'hémolyse avait été produite par action sur les globules d'un système hémolytique.

III. Nous avons au cours de ces expériences précisé deux faits :

a) Le titre d'un sérum agglutinant (titre qui a été préalablement fixé par la technique préconisée par la Commission d'Hygiène de la Société des Nations) diffère suivant que l'on fait réagir ce sérum sur des globules entiers ou sur des stromas globulaires. Dans ce dernier cas on note une baisse sensible du pouvoir agglutinant : par exemple un sérum actif au 1/256 avec les globules rouges n'agglutine plus les stromas qu'au 1/128, baissant même parfois jusqu'au 1/64.

b) Les limites de pH dans lesquelles l'hémoagglutination est susceptible de se produire vont — limites extrêmes — de 4,8 à 8,5.

Toutes nos expériences concordent à montrer que l'hémoglobine ne joue aucun rôle dans la réaction d'agglutination ; sa présence est indifférente. Son absence dans le stroma n'empêche pas l'agglutination de se produire ; sa présence, après réadsorption, ne modifie pas une agglutination déjà existante.

Les agglutinogènes A et B sont fixés sur le stroma et tout se passe avec le stroma comme avec les globules entiers (sauf la diminution du taux d'agglutination). Les stromas des globules rouges A et B sont agglutinés respectivement par les sérums A et B ; ceux du groupe AB sont agglutinés à la fois par les deux sérums, ceux du groupe O n'ont jamais donné d'agglutination.

\* \*

B. ESSAIS D'ADSORPTION. — 1° *Adsorption par les hématies de mouton des agglutinines des sérums humains.* — *Technique :* 4 cent. cubes d'une dilution au 1/2 de globules de mouton défibrinés et lavés sont mélangés à 0 c. c. 5 de sérum agglutinant  $\beta$  (sang du groupe A $\beta$ ) dont le titre a été préalablement fixé. On mélange intimement ; on met à l'étuve à 37° pendant une heure, on centrifuge.

a) On étudie le titre du sérum qui constitue le liquide surnageant : il n'a pas changé (on tient compte, bien entendu, de la dilution).



b) On retire le liquide surnageant et on lave à plusieurs reprises les globules à l'eau physiologique. On constate la présence d'agglutinines dans la première eau de lavage et rarement dans la seconde.

c) On hémolyse les globules rouges à l'eau distillée, on centrifuge et on examine le liquide surnageant. On n'y trouve jamais d'agglutinines.

2° *Adsorption des toxines par les hématies de cheval.* — Nous nous sommes proposé d'étudier l'adsorption des toxines diphthérique et tétanique par les globules rouges des chevaux. La technique suivie a été la suivante : le sang, recueilli dans de l'eau physiologique citratée, est d'abord centrifugé. Les globules, après avoir été lavés trois fois à l'eau physiologique, sont mis en contact, à l'étuve pendant deux heures (un contact plus prolongé n'a pas donné des résultats supérieurs), avec des doses variables de toxine (2 à 10 D. M). On pratique alors deux séries d'expériences. Dans une première série, on inocule à deux cobayes, respectivement, la totalité des globules rouges et du liquide surnageant. Dans une seconde série, on inocule à des cobayes, d'une part les globules lavés après leur contact avec la toxine, et d'autre part les différentes eaux de lavage. Nous avons fait des essais avec deux groupes de chevaux; les uns normaux, les autres dont l'immunisation était déjà très avancée, et ayant autant que possible un sérum riche en unités antitoxiques.

Dans la première série d'expériences (globules non lavés après la toxine), au moins lorsqu'il s'agit de chevaux normaux, le liquide surnageant et les globules rouges, injectés séparément, tuent toujours le cobaye. Les globules lavés après la toxine ne le tuent pas, mais l'eau de lavage non plus, alors que les globules non lavés le tuent. Tout se passe comme si les globules avaient retenu une partie de la toxine, partie du reste insuffisante à elle seule pour constituer une dose mortelle. Cette hypothèse se trouve fortifiée par le fait suivant que nous avons constaté : les globules rouges de chevaux, bien immunisés contre le tétanos, mis en contact avec de la toxine diphthérique, ne la fixent plus; il semble que ces globules soient déjà saturés par la toxine ou l'antitoxine tétanique. De même des animaux qui, comme le rat, sont naturellement réfractaires à

la diphtérie, ont des globules qui ne fixent pas ou d'une façon infime la toxine diphtérique.

C. ACTION RESPECTIVE DU SÉRUM NORMAL DE COBAYE (ALEXINE) SUR LES GLOBULES ROUGES HUMAINS DES QUATRE GROUPES. — *Technique.* — On mélange une émulsion au  $1/5$  de globules rouges défibrinés et lavés avec un sérum de cobaye dilué au  $1/2$ . A une dose fixe de 0 c. c. 05; 0,10; 0,20; 0,30; etc.

Le mélange 0 c. c. 1 de globules et 0 c. c. 1 de sérum de cobaye donne parfois l'hémolyse avec les hématies des groupes A $\beta$  et ABo; les mélanges contenant 0,2 et 0,3 de sérum la donnent toujours.

Avec les globules des groupes 0 $\alpha\beta$  et B $\alpha$  on n'obtient rien ou presque même en employant des doses massives de sérum.

Les résultats se sont montrés constants dans nos expériences établissant qu'il existe une certaine spécificité d'action du sérum normal de cobaye vis-à-vis des globules rouges d'homme.

D. POUVOIR ANTIGÉNIQUE DU SANG DES DIFFÉRENTS GROUPES. — Nous nous sommes proposé de rechercher par l'étude de la déviation du complément s'il existe dans les globules rouges un pouvoir antigénique spécifique particulier à chaque groupe sanguin.

*Technique.* — On prend comme *antigène* un extrait alcoolique de globules rouges préparé en mélangeant, dans un récipient à fond plat (type Erlenmeyer ou Fourneau), des globules défibrinés (ou un caillot) avec dix fois leur volume d'alcool absolu. On laisse pendant vingt-quatre heures à la glacière et trois jours à la température du laboratoire, en ayant soin d'agiter de temps en temps. On décante; on centrifuge; on reprend le liquide surnageant et on le laisse reposer pendant dix jours à la température du laboratoire. Au bout de ce temps on titre cet antigène par les méthodes utilisées pour titrer les antigènes qui servent à la réaction de Bordet-Wassermann.

Le sérum destiné à la réaction est obtenu en injectant à un lapin des globules humains d'un groupe déterminé. Ces globules sont injectés, soit dans le péritoine (3 injections à cinq jours d'intervalle 2 cent. cubes globules purs puis 2 cent. cubes de globules dilués au  $1/2$ ), soit dans la veine (2 injections de

5 cent. cubes de globules purs à huit jours d'intervalle). Le lapin est saigné cinq jours après la dernière injection. Son sérum agglutine les globules du groupe correspondant. Après injections de globules humains du groupe A $\beta$  le sérum agglutine les globules de ce groupe et celui du groupe ABo.

Il va sans dire qu'il faut préparer autant d'antigènes et de lapins qu'il y a de groupes sanguins afin de pouvoir pratiquer des réactions homologues et hétérologues.

La réaction de déviation, pratiquée suivant le procédé classique, nous a donné régulièrement les résultats suivants : le sérum d'un lapin immunisé avec les globules rouges humains du groupe A $\beta$  donne une réaction toujours positive avec les antigènes des globules rouges du groupe A $\beta$  et ABo et toujours négative avec ceux des globules B $\alpha$  et O $\alpha\beta$ .

Les mêmes expériences faites avec les antigènes B $\alpha$  et O $\alpha\beta$  et les sérums correspondants ne donnent pas de résultats nets.

Enfin au cours de ces recherches nous avons pu mettre en évidence le fait suivant : si on injecte à un lapin antimouton des globules rouges du groupe A ou AB on augmente le pouvoir hémolytique du sérum de ce lapin. On n'obtient pas ce résultat avec les globules du groupe B.

\*  
\* \*

Riche de promesses et déjà de faits bien établis, la question des groupes sanguins mérite de retenir, pour de nouvelles recherches, l'attention des biologistes. A l'intérêt scientifique que présente cette question vient s'ajouter l'espoir d'importantes applications pratiques.

---

Le Gérant : G. MASSON.





## PIERRE DESCOMBEY <sup>(1)</sup>

1895-1930

---

Est-il plus triste destin que celui de ce savant de trente-cinq ans, victime d'un accident banal, laissant une veuve avec trois petits enfants et inachevés des travaux pleins de promesses!

Pierre Descombey était un laborieux, de caractère réservé, d'esprit réfléchi et tenace. Pendant ses études à l'École vétérinaire d'Alfort il avait fait preuve des solides qualités qui lui valurent le premier rang en même temps que l'estime de ses maîtres et de ses camarades. Dès son entrée à l'Institut Pasteur, en 1921, il a montré qu'il était de ceux à qui l'on peut remettre en toute sécurité une tâche importante et délicate. Il a rempli, en effet, celle qui lui était confiée avec intelligence et exactitude, ne transigeant jamais avec le devoir. Descombey se reposait des besognes pratiques par la recherche scientifique. Le tétanos a été le sujet de prédilection de ses études. Il ne craignait pas d'entreprendre des expériences de longue haleine, moins désireux de publier beaucoup que de produire des travaux achevés.

Nous perdons en Descombey un collaborateur sur lequel nous comptions pour diriger un de nos services, selon les traditions pastoriennes. Sa famille est privée d'un soutien courageux devant les difficultés de la vie. La mort de Pierre Descombey est un malheur pour les siens et aussi pour l'Institut Pasteur qui conservera son souvenir et fera le possible pour alléger la peine de sa veuve et de ses enfants.

16 juillet 1930.

(1) Paroles prononcées par M. Roux devant le cercueil de Pierre Descombey, mort accidentellement le 14 juillet 1930.



